

# **Verlauf Immunologischer Parameter unter Sublingualer Immuntherapie**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jürgen Gäullein

geboren am 23.09.1971 in Lauda

**Gutachter :**

1. PD Dr. U. Markert, Jena
2. Prof. Dr. Dr. C. Kroegel, Jena
3. Prof. Dr. G. Zwacka, Apolda

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6. September 2010

## **Abkürzungsverzeichnis**

APC	Antigenpräsentierende Zellen
ARIA	Allergic Rhinitis and It's Impact on Asthma
AWMF	Arbeitsgemeinschaft Wissenschaftlicher Medizinischer Fachgesellschaften
CD	Cluster of Differentiation
CREATE	Development of Certified Reference Materials for Allergenic Products and Validation of Methods for their Quantification
DC	Dendritische Zellen
DGAKI	Deutsche Gesellschaft für Allergologie und Klinische Immunologie
DBPC	Doppelblind Placebokontrolliert
DNCG	Dinatriumcromoglycat
EAN	The European Aeroallergen Network
ECHRS	European Community Respiratory Health Survey
FEV1	Forcierte Einsekundenkapazität
HLA	Human Leukocyte Antigene
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
LHC	Langerhansche Zellen
MAS	Multizentrische Allergiestudie
SCIT	Subkutane Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T-Helfer Zelle
Treg	T-regulatorische Zelle
WHO	World Health Organisation

## Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	6
2.	Einleitung	8
2.1	Allergie	8
2.1.1	Definitionen	8
2.1.2	Aktuelle Aspekte	8
2.1.2.1	Epidemiologie	8
2.1.2.2	Auswirkungen des Klimawandels	9
2.2	Pathomechanismen der allergischen Typ I Reaktion	11
2.2.1	Genetische Faktoren	11
2.2.2	Umweltfaktoren	12
2.2.3	Immunologische Prozesse	13
2.2.3.1	Allergene	13
2.2.3.2	Effektormechanismen	14
2.3	Besondere Aspekte der allergischen Erkrankungen im Kindesalter	16
2.3.1	Prävalenzen von Erkrankungen des atopischen Formenkreises	16
2.3.2	Möglichkeit der Prävention	17
2.3.3	Besonderheiten der Therapie	18
2.4	Stellenwert der SLIT	18
2.4.1	Indikationen	19
2.4.2	Kontraindikationen	20
2.4.3	Unerwünschte Wirkungen	20
2.4.4	Effektivität	20
2.4.5	Ausblick und Möglichkeiten	21
2.5	Auswirkungen der SLIT auf das Immunsystem	22
2.5.1	Adjuvantien	22
2.5.2	IgE / IgG	22
2.5.3	Änderung des Zytokinmilieus	23
2.5.4	Leukozytenveränderungen	24
2.5.5	Mukosale Immunantwort	25

3.	Ziele der Arbeit	27
4.	Materialien und Methoden	28
4.1	Aufbau der Anwendungsbeobachtung	28
4.2	Therapie mit Sublivac®	29
4.2.1	Sublivac®	29
4.2.2	Therapieschema	29
4.3	Intrazelluläre Interleukinmessung und Extrazelluläre Lymphoytenmarker mittels FACS	30
4.3.1	Chemikalien	30
4.3.2	Puffer, Antikörper, Fertigkits	31
4.3.3	Untersuchungsmaterial	32
4.3.4	Geräte	32
4.3.5	Durchführung der intrazellulären Messungen	32
4.3.6	Bestimmung der extrazellulären Lymphozytenmarker	34
4.4	Kurzübersicht der gemessenen Parameter	35
4.5	Klinische Datenerhebung	36
4.6	Datenauswertung und Statistik	36
5.	Ergebnisse	37
5.1	Klinische Daten	37
5.1.1	Befindlichkeitsscore	37
5.1.2	Rhinitisscore	38
5.1.3	Medikamentenbedarf	39
5.1.4	Asthmaausprägung	40
5.1.5	FEV 1	41
5.1.6	Unerwünschte Wirkungen	43
5.2	Immunologische Parameter	43
5.2.1	Vergleich extrazellulärer Lymphozytenmarker auf Lymphozyten der B-Zell-Reihe vor und unter SLIT mit denen gesunder Kontrollen	44
5.2.1.1	CD23	44
5.2.1.2	CD86	45
5.2.1.3	CD124	46

5.2.2	Vergleich extrazellulärer Lymphozytenmarker auf Lymphozyten der T-Zell-Reihe vor und unter SLIT mit denen gesunder Kontrollen	47
5.2.2.1	CD154	47
5.2.2.2	CD54	48
5.2.2.3	CD69	49
5.2.3	Vergleich und Stimulierbarkeit intrazellulärer Interleukine in CD3 positive Lymphozyten vor und unter SLIT mit denen gesunder Kontrollen	50
5.2.3.1	IFN- $\gamma$	50
5.2.3.2	CD154	51
5.2.3.3	IL-2	52
6.	Diskussion	54
6.1	Klinische Daten	55
6.2	Immunologische Resultate	56
6.2.1	Extrazelluläre Parameter	57
6.2.1.1	CD23	57
6.2.1.2	CD154	57
6.2.1.3	CD86	58
6.2.1.4	CD124	59
6.2.1.5	CD54 (ICAM-1)	60
6.2.1.6	CD69	61
6.2.2	Expression intrazellulärer Parameter nach unspezifischer Stimulation	62
6.2.2.1	IFN- $\gamma$	62
6.2.2.2	IL-2	63
6.2.2.3	CD154	63
7.	Schlussfolgerung	65
Anhang		
	Klinischer Erhebungsbogen	67

Abbildungsverzeichnis	68
Tabellenverzeichnis	69
Literatur und Quellenverzeichnis	70
Danksagung	88
Lebenslauf	89
Publikationen	91
Ehrenwörtliche Erklärung	93

# **1. Zusammenfassung**

## **Einführung**

Die Immuntherapie gilt als kausale Therapiemöglichkeit von atopischen Erkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale oder der allergischen Rhinokonjunktivitis. Während die subkutane Form dieser Therapie in Deutschland als etabliert und wirksam gilt, konnte sich die sublinguale Anwendung aufgrund fehlender Daten im pädiatrischen Anwendungsbereich noch nicht durchsetzen. Diese ist nebenwirkungsarm und kann selbständig durchgeführt werden. Die Studienlage verbesserte sich in den letzten Jahren zunehmend. Die Therapie-schemata und Extrakte wurden optimiert und etliche kontrollierte Studien veröffentlicht.

## **Ziele**

Diese Untersuchung ist initiiert worden, um einen Beitrag zur Überprüfung der Wirksamkeit und zur Erforschung des Wirkmechanismus der Sublingualen Immuntherapie zu leisten. Mit dieser Arbeit soll der Einfluss von Sublivac Best© auf die Ausprägung von atopischen Symptomen und spezifischen Laborparametern untersucht werden.

## **Methoden**

Im Untersuchungszeitraum wurden 61 Kinder im Alter zwischen 6 und 18 Jahren zu Befindlichkeit und allergischen Symptomen von Professor Zwacka untersucht. Zusätzlich wurden die identisch erhobenen klinischen Daten von weiteren 81 Patienten der gleichen Altersgruppe aus einer früheren Untersuchung verwendet. Diese Kinder wiesen unterschiedliche Monosensibilisierungen gegen Gräser, Milben oder Frühblüher auf. Die Ergebnisse wurden mittels standardisierten Vorgehens erhoben und in definierte Scores umgewandelt. Zudem wurde den 61 Kindern Vollblut entnommen und mittels FACS-Analyse die Expression von lymphozytären Oberflächenmolekülen wie CD23, CD86, CD124, CD154, CD54, CD69 analysiert. Außerdem wurde die Expression von intrazellulären Interleukinen (IFN- $\gamma$ , CD154 und IL-2 ) vor und nach unspezifischer Stimulation untersucht.

## **Ergebnisse**

Die Auswertung der Daten ergab eine deutliche signifikante Verbesserung der untersuchten klinischen Symptome. Zudem wurden unter Therapie höhere FEV1 Werte gemessen, was auf



eine objektive Verbesserung der obstruktiven Symptomatik schließen lässt. 91% empfanden keinerlei Nebenwirkungen unter der Therapie. Die verbliebenen 9% gaben milde lokale Schleimhautirritationen und leichtes Jucken in der Mundhöhle an.

In der Analyse der labortechnisch erhobenen Daten zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression des IL4-Rezeptors CD124 auf B-Lymphozyten unter Therapie, während CD23 nicht-signifikant geringer nachweisbar war. Für CD86 waren keine Unterschiede messbar. Auf T-Lymphozyten konnten wir eine signifikant geringere CD69 Expression unter sublingualer Immuntherapie nachweisen. Das CD54 Molekül war während der Behandlung zwar vermehrt nachweisbar, jedoch ohne Signifikanz. Ebenfalls nicht signifikant war die reduzierte Expression von CD154 unter SLIT. Die Induzierbarkeit von intrazellulärem IFN- $\gamma$  war unter laufender Therapie signifikant erhöht, CD154 war intrazellulär unter Therapie geringer induzierbar als vor Therapiebeginn. Interleukin 2 konnte ebenfalls während der Behandlung signifikant stärker induziert werden als vorher.

### **Schlussfolgerung**

Die Resultate dieser Untersuchung unterstreichen die bisher vorliegenden Arbeiten zur Wirksamkeit der Sublingualen Immuntherapie. So verbesserte sich das klinische Befinden der Patienten signifikant, einige der im Labor untersuchten lymphozytären Merkmale wurden vor und während der Therapie in unterschiedlichem Maße exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich mit vorhandenen Daten von Behandlungen mit anderen SLIT-Präparaten und legen eine immunologische Reaktion unter der Therapie nahe, welche nicht nur auf die orale Schleimhaut begrenzt ist. Während der Behandlung war die Expression des lymphozytären Aktivierungsmarkers CD69 signifikant niedriger als zuvor. Im Zusammenhang mit der deutlich verbesserten Beschwerdesymptomatik ist von einem geringeren Aktivierungszustand der B-Zelle unter Therapie auszugehen. CD124, ein IL-4 Rezeptor, war ebenfalls unter Therapie signifikant erniedrigt. Die unter Therapie verstärkt induzierbaren intrazellulären Moleküle IFN- $\gamma$  und IL-2 sind mit der Theorie der Beeinflussung des TH1/TH2 Verhältnisses zugunsten der TH1-Antwort durchaus vereinbar.

Allerdings handelt es sich bei dieser Untersuchung um eine Anwendungsbeobachtung, welche erste Tendenzen der Immunantwort und Aussagen zur klinischen Effektivität aufzeigen sollte. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung war es noch nicht möglich, mit verbundenen Stichproben zu arbeiten.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Allergie**

#### **2.1.1 Definitionen**

Der Wiener Kinderarzt Clemens Pirquet, Freiherr von Cesenatico, definierte 1906 Allergie als eine pathologisch veränderte Reaktionsfähigkeit eines Organismus auf exogene Substanzen, welche er wiederum Allergene nannte. (Pirquet 1906) Er entlehnte diesen Begriff dem griechischen Wort „Allos“, was sinngemäß die Abweichung von einer normalen Körperreaktion aufzeigen sollte. Immunität bezeichnete er an gleicher Stelle als klinische Reaktionslosigkeit nach Einbringung fremder Substanzen. Der Begriff der Atopie wurde 1923 von Coca und Cooke (Coca und Cook 1923) geprägt. Auch dieser immunologische Begriff stammt aus dem Griechischen (atopos- ungewöhnlich) und sollte die ungewöhnliche Reaktion des Körpers auf eigentlich harmlose Einflüsse der Außenwelt ausdrücken. Heute versteht man unter diesem Begriff die vererbte Neigung der Überempfindlichkeit von Haut und Schleimhäuten gegenüber Umweltstoffen mit vermehrter Ig-E Produktion und/oder veränderter unspezifischer Reaktivität. Zu dem Kreis der atopischen Erkrankungen zählen damit die allergische Rhinitis, Konjunktivitis und Enteritis, das allergische, oder extrinsche, Asthma bronchiale und die atopische Dermatitis. (Ring et al. 2004) Die Einteilung der Hypersensitivitätsreaktionen in die Typen I – IV erfolgte 1963 von Coombs und Gell. Die Typ I Reaktion wird von vielen Autoren heute der Allergie gleichgesetzt.

#### **2.1.2 Aktuelle Aspekte**

##### **2.1.2.1 Epidemiologie**

Erkrankungen des allergischen Formenkreises sind weltweit verbreitet. Aufgrund ihrer hohen Prävalenz und steigender Inzidenz sind diese als bedeutende medizinische und ökonomische Probleme anzusehen. (ISAAC 1998) Die Prävalenz der allergischen Rhinokonjunktivitis bei 13 bis 14 jährigen Kindern variiert von unter 5% in den baltischen Staaten bis zu 30 % in Großbritannien. (ISAAC 1998). Im Vergleich dazu wird für Finnland eine Prävalenz von 15%

angegeben. Die Tatsache, dass sich Finnland in unmittelbarer Nähe zu den baltischen Staaten befindet, sich zudem die ethnische und damit genetische Zusammensetzung der Bevölkerung ähnelt, lässt die Frage aufkommen, inwiefern und auf welche Weise die Lebensweise von modernen Gesellschaften Einfluss auf die Pathogenese der Atopischen Erkrankungen nimmt. Selbst innerhalb Deutschlands sind signifikante Unterschiede zu beobachten. So zeigt die multizentrische ECHRS Studie eindrucksvoll, wie sich die Häufigkeit der allergischen Rhinitis bei 20 bis 44 jährigen Erwachsenen in den Studienorten Erfurt (13%) und Hamburg ( 22 % ) unterscheiden. (Heinrich et al. 2002) Ähnliches wurde in der gleichen Altersgruppe über die Häufigkeit der bronchialen Hyperreaktivität berichtet.

Diese Zahlen lassen einen Zusammenhang zwischen dem westlichen Lebensstil und der Prävalenz von atopischen Erkrankungen vermuten. Dieser Effekt ist ebenfalls in Untersuchungen zu erkennen, welche die Entwicklung im Deutschland der Nachwendezeit zum Gegenstand hatten. (Krämer et al. 2002) So wurden Kinder in Leipzig, Köln und anderen Städten der neuen und alten Bundesländer mittels IgE und Skintest auf Sensibilisierung gegenüber verschiedener Allergene untersucht. Es stellte sich heraus, dass Kinder, welche vor der Wiedervereinigung in den neuen Ländern geboren wurden, weniger unter allergischen Symptomen litten. Im Osten und Westen Deutschlands wurde eine zunehmende Prävalenz des allergischen Asthmas beobachtet. Weitergehende Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen der individuellen Immunantwort und der individuellen Herkunft. So neigten Personen, welche im Osten Deutschlands aufgewachsen waren, eher zu TH1-Antwort. Im Westen aufgewachsene Individuen dagegen eher zur allergietypischen TH2 Antwort. (Nicolai et al. 1997 und Renz et al. 2002)

Im Jahre 1998 gaben, je nach Altersgruppe, 25 bis 43% aller erwachsenen Bundesbürger an, unter mindestens einer allergischen Erkrankung zu leiden. (Herrmann-Kunz 1999) Dies verdeutlicht die enorme sozioökonomische Bedeutung der Erkrankungen des allergischen Formenkreises.

#### 2.1.2.2 Auswirkungen des Klimawandels

Die Veränderung der klimatischen Verhältnisse aufgrund des Klimawandels zieht eine Veränderung der Flora mit sich (d'Amato 2007 ), was sich seit einigen Jahren auch in der Bundesrepublik nachweisen lässt. Exemplarisch ist hier die Beifußambrosie (lat. *Ambrosia artemisiifolia* ) zu nennen, welche zur Zeit des 1. Weltkrieges aus Nordamerika nach Europa eingeschleppt wurde. Ihre Pollen gelten als hochallergen und sind für einen Großteil der

Pollenallergien in Nordamerika und mittlerweile auch in Südeuropa verantwortlich. Allein in den letzten Jahren hat sich die Zahl der Ambrosia-Allergiker in Frankreich, Italien und Ungarn verdreifacht. Mittlerweile sind größere Bestände im süd-, und ostdeutschen Raum bekannt. Pollenmessungen bestätigen die Beobachtung der Botaniker, sodass in den nächsten Jahren auch in Deutschland von einer steigenden Anzahl an Sensibilisierung mit Ambrosia ausgegangen werden muss. ( Alberternst 2006 ) Diese Pflanze ruft in ihren ursprünglich beheimateten Regionen Frankreich und Italien in bis zu 12 % der Bevölkerung allergische Symptome hervor. ( Tamarcaz et al. 2005 ) Eine weitere Verbreitung dieser Pflanze und deren hochallergenen Pollen bedeutet wohl auch für die Bundesrepublik eine unabwendbare Gefahr. Die milden Winter der letzten Jahre, höhere Frühlingstemperaturen und frühere Blütezeiten verstärken zudem die saisonale Belastung und verkürzen die symptomfreien Intervalle der Winterzeit.( EAN-Pollenflugnetzwerk ) Eine Analyse des Pollenfluges von 1974 bis 2001 kam zu dem Ergebnis, dass sich Start und Höhepunkt der Pollensaison von Frühblüher ( Erle, Weide, Hasel, Ulme ) im Schnitt um 20 Tage nach vorne verlagerten. Zudem wurde für einige Allergene wie Gräser und Kräuter eine Verlängerung der jährlichen Pollenflugperiode nachgewiesen. Regional auf den Alpenraum begrenzt war eine erhöhte aerogene Konzentration der Pollen auffällig. ( Jäger et al. 2001 und Shea et al. 2009 ) Anhand dieser Datenlage ist ein Einfluss der schwer aufzuhaltenden klimatischen Veränderungen auf die Pollenemission und damit auf die individuelle Pollenbelastung nicht von der Hand zu weisen. Demnach wird die Sensibilisierungsrate der Bevölkerung in den nächsten Jahren weiter zunehmen. Eine Therapieform wie die SLIT, welche in die Pathogenese eingreift, könnte individuellen Leidensdruck verringern und enorme sozioökonomische Einsparungen ermöglichen.



Abb. 1 Bestand der Beifuß-Ambrosie an einer Bundesstraße bei Mannheim



Abb.2 Beifuß-Ambrosie zu Beginn der Blüte

## 2.2 Pathomechanismen der Allergischen Typ I Reaktion

Mit der Methode der sublingualen Immuntherapie bietet sich eine der seltenen therapeutischen Möglichkeiten, kausal in die Pathogenese einzugreifen. Für Optimierung und Verständnis dieser Therapieform ist es unerlässlich, sich den Pathomechanismen der Allergie zuzuwenden.

### 2.2.1 Genetische Faktoren

Man geht davon aus, dass 40 % aller Individuen, welche in Gebieten mit westlichem Lebensstandard leben, eine genetische Disposition zu atopischen Reaktionen in sich tragen. (Kunz 2000) Die Komplexität einer Immunreaktion, an der viele verschiedene Rezeptoren, Interleukine und andere Proteine beteiligt sind, legt den Schluss nahe, dass zahlreiche unterschiedliche genetische Prädispositionen existieren. Genuntersuchungen an Familien, in denen eine gehäufte Atopieneigung besteht, belegen z.B. Mutationen auf den Chromosomenregionen 11q und 5q. Die Gene in diesen Regionen determinieren die Immunantwort mittels IgE. (Abramson und Harrap 1998) Die Gene auf Chromosom 11 codieren eine Untereinheit des hochaffinen IgE Rezeptors, während sich auf Chromosom 5 die Gene der Interleukine Interleukin-3, IL-4, Interleukin-5, Interleukin-9, Interleukin-12, IL-13 und GM-CSF befinden. (Sengler et al. 2003 und Pinto et al. 2009) Diese Zytokine sind wichtig für den IgE Isotypenswitch und die Mastzellproliferation. Bestimmte T-Zell Rezeptor Gene auf dem Chromsom 14q sind mit einer verstärkten IgE Antwort assoziiert. (Abramson und Harrap 1998) Zudem wird eine Mutation der alpha Untereinheit des Rezeptors für eine vermehrte Signaltransduktion beschrieben. Außerdem wird eine Atopieneigung mit bestimmten HLA II Allelen in Verbindung gebracht. So führen einige MHC Subtypen Proteinkombinationen zu verstärkter TH2 Antwort und begünstigen dadurch eine allergische

Reaktion. Andere Gene, welche mit einer IgE vermittelten überschießenden Immunreaktion in Verbindung gebracht werden, codieren den  $\beta 2$  adrenergen Rezeptor, was eine erhöhte bronchiale Reaktivität zur Folge hat, und das 5-Lipoxygenase Gen, was wiederum eine veränderte Leukotrien Produktion bedingt. Es werden zahlreiche weitere Genloci, wie 6p21,16p11-12 und 20p13, mit atopischen Pathomechanismen in Verbindung gebracht; die Anzahl der entdeckten Gene wird mit dem Fortschreiten der Genidentifizierung wohl noch ansteigen. (Pinto et al. 2008) Oben genannte Faktoren und Mechanismen sind aber nur als Prädisposition anzusehen. Diese genetische Prädisposition variiert zudem in einzelnen ethnischen Volksgruppen, was eine Determinierung und Klassifizierung erschwert. So sind in hispanischstämmigen Individuen andere Mutationen zu finden als bei afroamerikanischen oder weißen Amerikanern. (Herborn 2002)

Eine pathologische Reaktion des Körpers tritt nur auf, wenn exogene Ursachen hinzutreten. Diese sind vor allem in der individuellen Umwelt zu finden.

### **2.2.2 Umweltfaktoren**

Die Tatsache, dass atopische Erkrankungen mit dem Lebensstandard und dem Hygienebewusstsein zunehmen, deutet auf eine wichtige Rolle der Umwelt und des Hygieneverhaltens hin. Kinder, welche die ersten Lebensjahre in einer bäuerlichen Umgebung auf dem Land verbringen, entwickeln signifikant weniger asthmatische Beschwerden. (Riedler et al. 2001) In diesem Zusammenhang postulierte man die Hygienehypothese, welche eine frühe kindliche Exposition mit bestimmten „Schmutzantigenen“ einen protektiven Effekt im Sinne einer verstärkten TH1-Antwort zuschreibt. (Yazdanbakhsh et al. 2002 und Mutius 2007) Strachan beschrieb bereits 1989 einen Zusammenhang zwischen Anzahl der Kinder eines Haushaltes und dem Auftreten von allergischen Reaktionen. Erstgeborene und Einzelkinder zeigten demnach überproportional häufiger allergische Symptome als ihre jüngeren Geschwisterkinder oder Kinder aus großen Familienverbänden. (Strachan 1989 ). Einen ähnlichen Effekt scheint der frühe Besuch einer Kindertagesstätte zu bewirken, wo ein enger Umgang der Kinder miteinander unausweichlich ist. (Krämer et al. 1999). Die Datenlage zur Haustierhaltung ist widersprüchlich und scheint je nach Art des Haustieres unterschiedlich zu sein. So zeigte sich, dass Kinder, welche mit Hunden zusammen in einem Haushalt aufwuchsen (Chen et al. 2008), weniger gegen Pollen sensibilisiert waren, aber keine vermehrte Sensibilisierung gegenüber Hundeantigenen ausbildeten. Im Gegensatz dazu

konnte eine Exposition der Kinder mit Katzenallergenen keinen protektiven Effekt bewirken. (Lau et al.2005)

Feinstaub, insbesondere Dieselabgase, welcher besonders in Ballungsräumen mit hohem Verkehrsaufkommen nachgewiesen wird, kann als wichtiger exogener Triggerfaktor angesehen werden. Die Rußpartikel lagern sich an Pollen an und führen zu morphologischen Veränderungen. Diese erhöhen das Allergiepotential der Pollen, bewirken damit eine verstärkte IgE Antwort der betroffenen Personen. (Boutin und Hammou 2005 und Gaudermann et al. 2004 und Mc Creanor und Cullmann 2007). Kinder, welche an Hauptstraßen oder in direkter Nähe davon wohnen sind damit gefährdet eine atopische Erkrankung zu entwickeln. (Morgenstern et al. 2008)

Das sogenannte Passivrauchen des Kindes in der elterlichen Wohnung gilt ebenso als Triggerfaktor für asthmatische Beschwerden und sollte vermieden werden. (Carlsen 2005 und Thomsen 2007)

### **2.2.3 Immunologische Prozesse**

#### **2.2.3.1 Allergene**

Allergene stellen eine sehr heterogene Gruppe von Proteinen dar, welche pflanzlichen, tierischen, mikrobiellen oder chemischen Ursprungs sein können. Allen gemeinsam ist ein Molekulargewicht von 5000 bis 7000 Dalton. Die Ursache der Pathogenität ist noch nicht bekannt.

Obwohl die Frage, weshalb Substanzen allergene Eigenschaften besitzen oder nicht, noch nicht eindeutig geklärt ist, scheinen einzelne Molekülstrukturen, die sogenannten Epitope, der Proteine eine wichtige Rolle zu spielen. Am verbreitetsten sind Sensibilisierungen gegen Antigene aus der Gruppe der Pflanzenpollen. (Grevers 2001) Viele der Agentien sind enzymatische aktive lösliche Proteine mit geringem Molekulargewicht, die in geringer Dosis eine TH2 Antwort auslösen können. Ein Beispiel ist das Hauptallergen der Hausstaub-, oder Milbenallergie Der p 1, was eine Protease ist, die den IL-2 Rezeptor spalten kann, was wiederum eine verminderte TH1 Antwort zur Folge hat. Weitere wichtige Allergene sind

verschiedenen Pollenallergene, Insektengifte, Bestandteile von Schimmelpilzsporen, Haut-, Speichel-, Kotkomponenten unterschiedlicher Tiere wie z.B. Fel D 1 aus dem Speichel der Hauskatze, sowie einige Nahrungsbestandteile und Medikamente. Veränderungen an der Pollenoberfläche aufgrund der zunehmenden Luftverschmutzung sind seit einigen Jahren bekannt. (Boutin und Hammou 2005 und Mc Creanor et al. 2007) Außerdem sind Kreuzreaktionen sowohl zwischen Inhalationsallergenen untereinander als auch zu anderen Allergengruppen wie z.B. Nahrungsmittelallergenen vorhanden. So reagieren z.B. bis zu 20% der Birkenpollenallergiker ebenfalls auf Apfelbestandteile allergisch. Dafür sind ähnliche Epitope der Einzelsubstanzen verantwortlich. (Ring et al. 2004 )

Davon abzugrenzen sind sogenannte Haptene, welche per se nicht allergen wirksam sind, sondern erst in Verbindung mit einem Trägerprotein allergene Potenz bekommen. Dies ist z.B. bei der Penicillinallergie der Fall. Allen Allergenen ist zudem gemeinsam, dass sie eine TH2 Antwort mit konsekutiv erhöhter IgE Produktion induzieren können.

### 2.2.3.2 Effektormechanismen

Während die TH1 Antwort vorwiegend bei bakteriellen oder viralen Infektionen zu beobachten ist, spielt in der Pathogenese der allergischen Typ I Reaktion die TH2 Antwort mit folgender überschießender IgE Produktion eine zentrale Rolle.

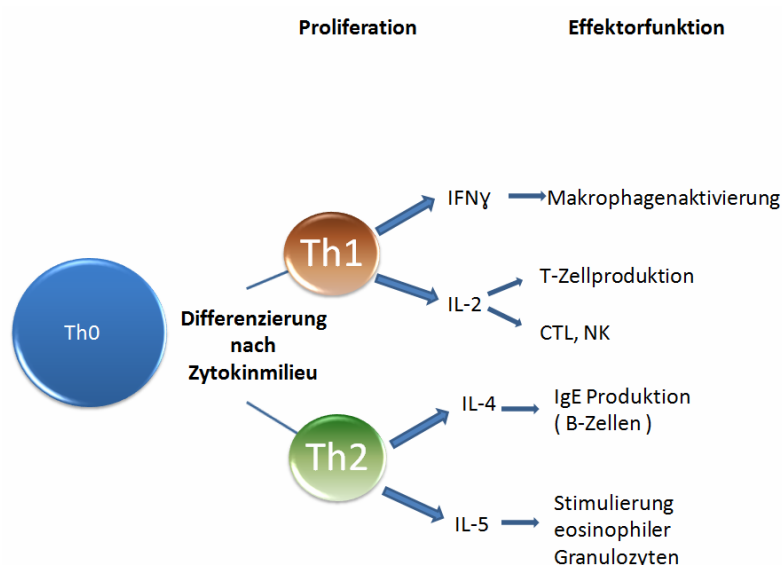


Abb.3 Einfluß von Zytokinen auf die Differenzierung einer TH0 Zelle zu TH1 bzw. TH2



Ein in das Gewebe eingedrungenes Antigen wird von APC prozessiert und Teile davon mittels MHC II exprimiert. In lokalen Lymphknoten reagieren nun präformierte TH0 Zellen mit den APC, wobei Art und Menge des Antigens, Aufnahmeweg, Costimulatoren und das Zytokinmilieu eine entscheidende Rolle für die weitere Differenzierung zu TH2 Zellen spielen. (Naclerio 1991, Romagnani 1992, Romagnani et al 1997) Der genaue Mechanismus der TH2 Induktion ist derzeit noch unbekannt. IL-4 scheint hierbei eine ausschlaggebende Rolle zu spielen, wobei es unklar ist, welche Zellen diesen initialen IL-4 Anstieg verursachen. Man vermutet eine Subspezies der CD4 Zelle, NK1.1+, welche IL-4 produziert und so die Differenzierung zu TH2 unterstützt. Aktivierte TH2 Zellen sezernieren nun autokrin IL-4 und Interleukin-1, welche den Immunglobulin-Isotypenswitch zugunsten IgE in den B-Zellen fördern, und die alternative Differenzierung der TH0 zu TH1 Zellen hemmen. B-Zellen, die mittels TH2 Zellen, IL-4 und Interaktion der CD Determinanten CD40 auf der B-, und CD40L auf der T- Zelle , aktiviert werden, beginnen IgE zu synthetisieren. (Bousquet et al. 1996 und Cauwenberge et al. 2000) Dieses IgE bindet nun auf der Oberfläche von Mastzellen am hochaffinen IgE Rezeptor.

#### Sofortphase

Kommt es nun zu erneutem Antigenkontakt, lagert sich das Antigen direkt an das mastzellgebundene IgE an. Es kommt anschließend zur Quervernetzung und zur Aktivierung der Mastzellen. Freisetzung von Histamin, Esterasen, TNF alpha (ICAM-1) und anderen Mediatoren ist die Folge. Aktivierte Mastzellen synthetisieren zudem Leukotriene, Prostaglandine und IL-4, was wiederum die Entzündungsreaktion verstärkt. Es resultieren die Symptome einer allergischen Frühreaktion mit erhöhter Gewebspermeabilität, Muskelkontraktion und Destruktion von Gewebe. Je nach Lokalisation der Eintrittspforte resultiert daraus eine allergische Rhinitis, Konjunktivitis, Asthma bronchiale, Nahrungsmittelallergie oder bei systemischer Reaktion eine Anaphylaxie.

#### Spätreaktion

Die allergische Spätreaktion ist gekennzeichnet durch das Fortbestehen des entzündlichen Milieus. Oben genannte Mediatoren der Sofortreaktion regulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen hinauf, was wiederum eine weitere Einwanderung von Leukozyten zur Folge hat. ( Grevers und Röcken 2001, Janeway et al. 2001)

## 2.3. Besondere Aspekte der Allergischen Erkrankungen im Kindesalter

### 2.3.1 Prävalenzen von Erkrankungen des atopischen Formenkreises

Im Kindesalter bestehen einige Besonderheiten in Bezug auf den Verlauf der atopischen Erkrankungen bzw. die Möglichkeit, auf diesen „Allergischen Marsch“ mittels konsequenter Therapie und Präventionsmaßnahmen therapeutischen Einfluss zu nehmen. Im ersten Lebensjahr zeigen etwa 10 % aller Säuglinge die Symptome einer Atopischen Dermatitis. Nach dem dritten Lebensjahr nimmt die Prävalenz leicht ab, eine vollständige Remission ist möglich. Einen großen Stellenwert nehmen in diesem Lebensabschnitt die Nahrungsmittelallergien bei ca 30 % der Kinder ein. (Wahn 2000)

Im Kleinkindalter nach dem ersten Geburtstag treten gehäuft die Allergische Rhinitis bzw. das Allergische Asthma Bronchiale in den Vordergrund. (Lau et al. 2002) Eine kausale Therapie, wie die spezifische Immuntherapie, reduziert nicht nur die Symptome und den Medikamentenverbrauch, sondern verhindert suffizient das Fortschreiten dieses Krankheitsgeschehens. (Bouquet et al. 2000, Bergmann et al. 2000, Bachert et al. 2002) Dies bedeutet neben der Reduzierung der individuellen Lebensqualität auch enorme ökonomische Einsparungen, da die Folgekosten signifikant reduziert werden. (Märtens und Lobermeyer 2001)

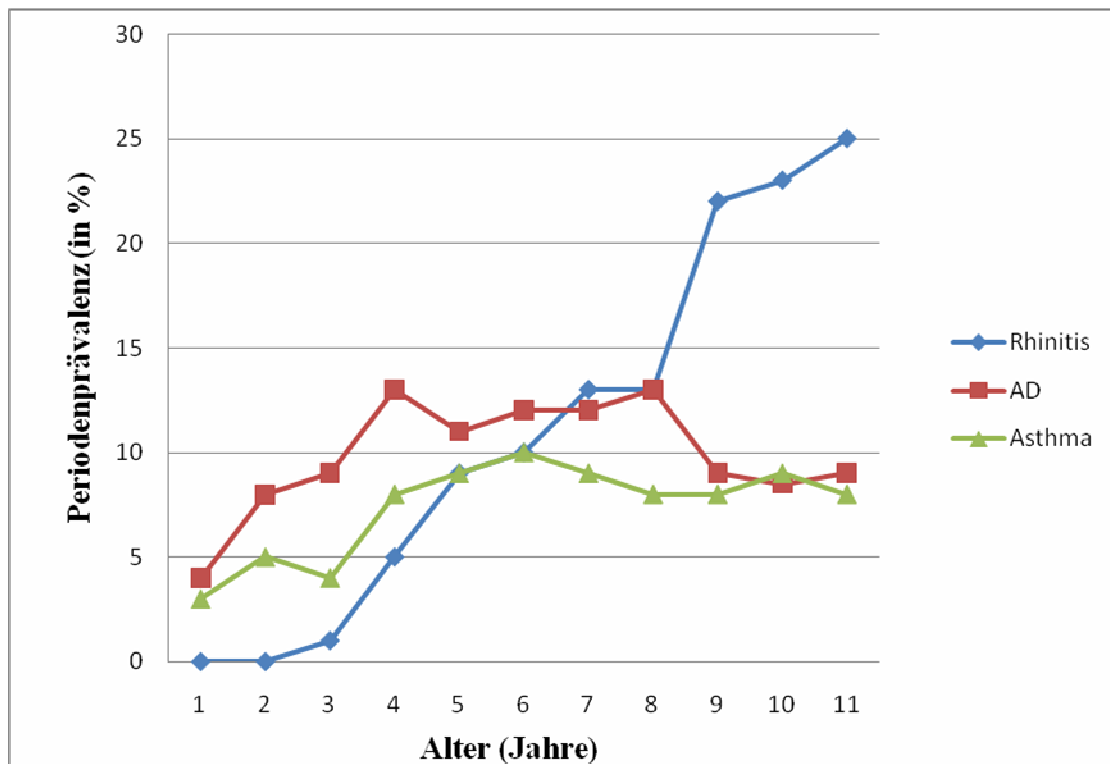


Abb. 4 Der Allergische Marsch, Verlauf der unterschiedlichen Atopieausprägungen.

Nach einer Erhebung des Statistischen Bundesamtes im Jahre 1998 litten damals insgesamt 6 - 7% der Kinder unter einer Atopischen Dermatitis, 3 - 7% unter Asthmatischen Beschwerden und etwa 3 - 11% an Allergischer Rhinitis. Untersucht wurden Kinder im Alter von 5 bis 15 Jahren. (Herrmann-Kuntz 1999)

### **2.3.2 Möglichkeit der Prävention**

Ziele der sogenannten Primärprävention sind eine Absenkung der Inzidenz und eine Reduktion der Sensibilisierungsraten. Einerseits ist mittels genauer Anamnese eine Identifizierung von familiär disponierten und damit allergiegefährdeten Personen sinnvoll, andererseits gilt es auch, die anamnestisch unauffälligen Personen vor der Entstehung von Atopischen Krankheiten zu schützen. In einem Positionspapier (Schmidt et al. 2003) von 2003 fordert die Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin folgende Verhaltensmaßnahmen: Stillen bis zum sechsten Lebensmonat, tabakfreies Umfeld schon während der Schwangerschaft, allergenarmes Wohnklima mit Verzicht auf Haustiere, späte und schrittweise Zufütterung von geeigneter Beikost. Aktuelle Untersuchungen zeigen zudem einen protektiven Effekt von hypoallergener Säuglingsmilch. (von Berg et al. 2008 und Osborn 2006 ) Die Datenlage zur Haustierhaltung ist wie beschrieben noch widersprüchlich. Seit einigen Jahren wird intensiv an der Bedeutung probiotischer Nahrungsadditive an der Allergieprävention geforscht. Zugrunde liegt die These, die mikrobielle Besiedelung des Magen-Darm-Traktes könne als Teil des Immunapparates eine Rolle spielen. Werdende Mütter, welche selbst oder deren Partner in Bezug auf Atopie eine genetische Disposition zeigten, bekamen in einer DBPC-Studie Lactobacillus GG verabreicht. Die Kinder der Mütter in der Verumgruppe, welche mit einem hohen Atopierisiko geboren wurden, entwickelten signifikant weniger atopische Symptome.(Kalliomäki et al. 2001). Allerdings stehen Langzeitergebnisse und weiter differenzierte Untersuchungen aus, in einer Metaanalyse 2007 waren die Ergebnisse sehr widersprüchlich, sodass noch keine Empfehlung ausgesprochen werden kann ( Osborn und Sinn 2007)

Die Sekundärprävention zielt hingegen auf die Verhinderung einer Chronifizierung bzw. einen Wechsel der Symptome. Die Therapie mittels Hyposensibilisierung zählt somit wie die konsequente Allergenmeidung zu den präventiven Maßnahmen bei nachgewiesener Sensibilisierung.

Unter Tertiärprävention versteht man hingegen alle Maßnahmen, welche zur Bewältigung chronischer Krankheiten förderlich sind, bzw. zur Vermeidung von Rückfällen oder weiterer Verschlechterung führen. ( Ring et al. 2004)

### **2.3.3 Besonderheiten der Therapie**

Grundsätzlich ähnelt die Therapie von atopischen Erkrankungen im Kindesalter in vielerlei Hinsicht derer im Erwachsenenalter. Die körperliche, geistige und emotionale Entwicklung der Kinder darf aber unter Therapie nicht beeinträchtigt oder gar geschädigt werden. So sollten neu auf dem Markt erschienene Substanzen nur äußerst kritisch angewendet werden. Die Therapie an sich sollte zudem in den Händen allergologisch erfahrener Pädiater erfolgen, um z.B. Wachstumsverzögerungen oder hormonelle Störungen unter Glukortikoidbehandlung frühzeitig zu erkennen. Eine offene, freundliche, kindgerechte Zuwendung des Arztes sollte selbstverständlich sein, um bei Chronifizierung des Leidens nicht noch eine Behandlungsphorie und damit eine verminderte Compliance entstehen zu lassen. Ebenso sollte das soziokulturelle Umfeld des Kindes wie Kindergarten, Schule, Verwandte über die Erkrankung des Kindes und eventuelle Sofortmaßnahmen informiert sein. Geeignete Präventionsmaßnahmen, konsequente Therapie, Allergenkarenz, altersgerechte Schulungen und Förderung von körperlicher Aktivität sind weitere Maßnahmen, um die Symptome der Erkrankung einzudämmen. (AWMF 2006)

## **2.4. Stellenwert der SLIT**

Zur Standardtherapie von allergischen Symptomen zählen Substanzen mit welchen sich eine Verbesserung der krankheitsbedingten Symptome erzielen lassen. Hierzu zählen, je nach Manifestation unterschiedliche Substanzen.

Antihistaminika, welche als kompetitive Antagonisten am Histaminrezeptor die Bindung von Histamin unterdrücken, verhindern somit histaminvermittelte Symptome wie Juck-, Niesreiz und Hypersekretion. Die Applikation ist lokal als auch systemisch möglich. Kortikoide inhibieren die Expression und Liberation von Entzündungsmediatoren, so werden neben komplexen Wirkungen auf das Immunsystem, die Ausprägung von Ödemen und die

Migration von Mastzellen in das Gewebe vermindert. Außerdem werden Mastzellstabilisatoren, Leukotrienantagonisten, Anticholinergika und  $\alpha$ -Sympathomimetika zur symptomatischen Therapie eingesetzt. Allerdings beeinflussen diese Therapeutika ausschließlich die Endstrecke der allergischen Reaktion. So ist zwar eine Symptomreduktion, aber keine dauerhafte kausale Therapie mit diesen Substanzen möglich. Der Krankheitsverlauf an sich, geschweige denn eine Progression ist mit diesen Substanzen nicht zu erreichen.

Die therapeutische Strategie der Immuntherapie zielt darauf ab, die zugrunde liegenden Pathomechanismen dauerhaft zu beeinflussen, so dass nach erfolgreicher Therapie ein dauerhaftes symptomfreies Leben möglich ist. Reber zeigte bereits in ihrer Arbeit mögliche Alternativen zur subcutanen Applikationsform der Immuntherapie auf. ( Reber 2007 ) Schneider erwähnte in ihrer Dissertation weitere Formen der Immuntherapie wie Plasmid-DNA und Ig-E Antikörper welche Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen waren, aber keine breite Anwendung fanden. (Schneider 2005) Die Sublinguale Immuntherapie bietet einen sicheren atraumatischen Therapieansatz und ist in der Zwischenzeit als Therapieform anerkannt worden.

### **2.4.1. Indikationen**

Obwohl sich die Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie 2006 zur Therapie von Kindern mit allergischen Symptomen mittels SLIT noch zurückhaltend äußert, sieht das Gremium durchaus Potential in dieser Behandlungsmethode. So wird die SLIT zur Therapie von allergischer Rhinokonjunktivitis Erwachsener empfohlen, wenn schwere systemische Nebenwirkungen sowie mangelnde Akzeptanz des Patienten gegen eine SCIT sprechen. Die niedrige Rate an Nebenwirkungen spricht hier eindeutig für diese Therapieform. Die unzureichende Datenlage für pädiatrische Patienten, welche zwar eine Wirkung aber noch keinen Wirkmechanismus aufzeigt, ist die Ursache, weshalb diese Therapieform für Kinder noch nicht offiziell von der DGAKI empfohlen wird. Als untere Altersgrenze sieht man derzeit 5 bis 6 Jahre an.

Grundsätzlich besteht eine Indikation zur Hyposensibilisierung, wenn eine entsprechende allergische Anamnese, ein positiver Hauttest und-, oder ein laborchemischer IgE Nachweis

bestehen. Es müssen geeignete wirksame standardisierte Allergenextrakte vorliegen. Eine Allergenkarenz sollte unmöglich oder sehr schwierig sein. (AWMF 2006 und Cauwenberge et al. 2000 )

#### **2.4.2 Kontraindikationen**

Da das Nebenwirkungsprofil der SLIT sehr niedrig ist, sind absolute Kontraindikationen schwer auszumachen. Für den sublingualen Applikationsweg gilt ähnliches wie für den subkutanen. Eine Therapie sollte unterlassen werden, wenn schwere immundefizitäre Krankheiten, maligne Neoplasien, nicht ausreichend therapiertes Asthma bronchiale, schwere kardiale Insuffizienz bestehen, Betablocker eingenommen werden oder eine unzureichende Compliance vorliegt. Während einer Schwangerschaft sollte aus Sicherheitsgründen eine Immuntherapie möglichst nicht begonnen , kann aber bei guter Verträglichkeit fortgeführt werden. ( AWMF 2006 und Cauwenberge et al. 2000)

#### **2.4.3 Unerwünschte Wirkungen**

Insgesamt gesehen treten Nebenwirkungen selten auf und sind von milder Qualität. Schleimhautreizungen und gastrointestinale Symptome sind möglich, differierten aber in der Häufigkeit nicht von denen der Placebogruppe. (Cauwenberge et al. 2000 und Didier et al. 2007 ).

#### **2.4.4 Effektivität**

Leider wurden in den ersten Jahren des neuen Jahrtausends nur wenige aussagekräftige Studien zum Thema SLIT im Kindesalter publiziert. Zudem erschwerte die Heterogenität der Präparate, der Anwendung sowie unterschiedliche Dosierungsschemata eine abschließende Beurteilung. In den Jahren 2003 und 2005 von Wilson (Wilson et al. 2003 und Wilson et al. 2005) in Allergy veröffentlichten Übersichtsarbeiten, in welchen nur doppelblind- und placebokontrollierte Studien eingeschlossen wurden, kommt der Autor zum Schluss, dass aufgrund niedriger Fallzahlen die vorliegende Studienlage noch nicht ausreicht, um die

Evidenz der SLIT bei pädiatrischen Patienten zu belegen, während die Datenlage für Erwachsene eine Reduktion der Symptomscores und des Medikamentenbedarfes belegt. In unseren Jenaer Anwendungsbeobachtungen lassen sich ebenfalls eindeutige Tendenzen zu Symptomreduzierung und sinkendem Medikamentenbedarf feststellen. (Schneider 2005 und Steiner 2006) Eine neuere Metaanalyse aus dem Jahre 2006 (Penagos et al. 2006) bestätigt unsere Beobachtungen. Untermauert wird diese These mit einer 2007 (Bachert 2007) veröffentlichten Übersichtsarbeit, welche mit einem einzelnen Präparat einer Firma durchgeführt wurde.

Eine aktuelle Veröffentlichung einer doppelblind-, und placebokontrollierten Studie der Berliner SLIT-Study-Group ( Wahn et al. 2009 ) kommt ebenfalls zu dem Resultat, dass unter SLIT weniger Medikamente von den Patienten verwendet werden, und sich das subjektive Wohlbefinden unter der Anwendung verbessert. Allerdings wurde diese Studie nicht mit Tropfen, sondern mit speziellen allergenhaltigen Tabletten durchgeführt. Ebenfalls erst kürzlich wurde eine Metaanalyse publiziert, welche Effektivität und Langzeitergebnisse von SCIT und SLIT bei pädiatrischen Patienten verglich. Auch hier konnte ein positiver Effekt bezüglich der allergischen Rhinokonjunktivitis und des allergischen Asthmas gezeigt werden. ( Larena-Linnemann 2008)

In den letzten Jahren wurde intensiv an der SLIT geforscht. Einige Forderungen der Vergangenheit wie Dosisoptimierung, Vergleichbarkeit der Präparate und gut geplante Studien wurden zum Teil schon erfüllt. Die aktuellen Ergebnisse bestätigen unsere positiven Beobachtungen und Erfahrungen.

#### **2.4.5 Ausblick und Möglichkeiten**

Im Einklang vieler Expertengremien und Fachgesellschaften (ARIA 2003 und DGAKI 2007) bietet die SLIT eine interessante Alternative zur SCIT ohne nennenswerte Nebenwirkungen zur Behandlung von Allergischen Reaktionen. Vorteile wie die einfache schmerzfreie Applikation, welche keinen Arztbesuch erfordert, und bessere Verträglichkeit liegen auf der Hand. In den letzten Jahren wurde die Datenlage zur Therapie von Erwachsenen etwas valider, sollte aber aufgrund der sehr heterogenen Allergene bzw. Allergenextrakte, besonders

bei Kindern, immer noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. (Penagos et al. 2006 und Bachert 2007 )

Unklar sind bisher der genaue Wirkmechanismus bzw. die immunologischen Reaktionen, welche die sublinguale Allergenapplikation hervorruft. Auch hier sind weitere Untersuchungen nötig. Zur Zeit wird ein oral/mukosaler Wirkmechanismus intensiv diskutiert. (Allam et al. 2008), welcher die Besonderheiten der oralen Schleimhäute berücksichtigt. Abschließend sollte man bedenken, dass eine rechtzeitige immunmodulatorische Therapie einen Etagenwechsel von der allergischen Rhinitis zum Asthma Bronchiale verhindern kann. Eine Ausweitung der allergischen Reaktionsbereitschaft auf weitere Antigene kann ebenfalls unterbunden werden. (desRoches et al. 1997, Pajano et al. 2001, Halken 2004, Inal 2007 )

## **2.5. Auswirkungen der SLIT auf das Immunsystem**

### **2.5.1 Adjuvantien**

Noch im Entwicklungsstadium befinden sich klinische Forschungen zu mukosaadhäsiven Substanzen. Diese sollen, in Kombination mit den entsprechenden Antigenen, den Kontakt des Antigens zur Schleimhaut intensivieren und die Aktivität der antigenspezifischen T-regulatorischen Zellen erhöhen. So werden im Ovalbumin Mausmodell eine Reduktion der Interleukin-5 und IgE Sekretion im Serum und eine erhöhte Expression von allergenspezifischen T-Zellen in den cervicalen Lymphknoten Induktion mittels Maltodextrinzugabe beschrieben. (Razafindratisa et al. 2007) Untersuchungen mit einer Kombination aus VitaminD3 / Dexamethason und Lactobacillus plantarum als Adjuvants zeigten beide eine erhöhte Expression von IL 10. (van Overtvelt et al. 2008)

### **2.5.2 IgE / IgG**

Immunglobulin E kann als entscheidendes Effektormolekül in einer allergischen Typ I Reaktion angesehen werden. Nach Bindung an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI auf Mastzellen und basophilen Leukozyten führt das zur Degranulation und Ausschüttung von Mediatoren wie Histamin und ist hiermit für die allergische Sofortreaktion verantwortlich.



(Grevers und Röcken 2001 ) Der verstärkten Expression von IgE liegt eine gesteigerte Produktion von IL-4 und IL-13 zugrunde, welche für einen Immunglobulinisotypenswitch zu IgE essentiell sind. In einem IL-4 reichen Milieu differenzieren naive TH0-Zellen zu TH2 Zellen, welche wiederum spezielle B-Zellen aktivieren. CD154 auf der TH2-Zelle und CD40 der B-Zelle fungieren dabei als Costimulus. Dies ist der Schlüsselmechanismus der erhöhten IgE Expression während einer allergischen Reaktion. Im Gegensatz dazu hemmt IFN- $\gamma$  die Produktion von IgE. Es ist naheliegend, den IgE Serumlevel als Parameter für den Erfolg einer Therapie zu verwenden. Während die Ergebnisse dieser Messungen für die Subkutane Desensibilisierung anerkannt ( AWMF 2006 und Bousquet et al. 1998) sind, stehen dem uneinheitliche Ergebnisse von Messungen unter sublingualer Immuntherapie gegenüber. (Bufe et al. 2004, Lima et al. 2002, Antunez et al. 2008, Pajno et al. 2000) Da mehrere Studien eine erfolgreiche Reduktion von Symptomen und des Medikamentenverbrauches belegen, wird für die SLIT die Möglichkeit eines alternativen Wirkmechanismus postuliert. Ebenfalls möglich scheint eine uneinheitliche Dosierung und Präparateanwendung in der Expression von IgE und protektivem IgG4 zu haben. So erreichte eine High-Dose-SLIT-Therapie immerhin 25% der subkutanen Anwendung, aber nur 4% des LOW-Dose-Regimes. (Rossi et al. 2007) Ott et al publizierten 2009 eine Studie, welche ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Ig4-Antikörper einer mit 5-Gräserpollenextrakt SLIT behandelten Gruppe gegenüber der Placebogruppe zeigte. (Ott et al. 2009) IgE als einer der Hauptmodulatoren der atopischen Endreaktion mit Mastzelldegranulierung und Histaminfreisetzung war in den letzten Jahren von großem pharmakologischen Interesse. Anti-IgE erwies sich als weitere therapeutische Option in der Behandlung des allergischen Asthmas mit vielfältigen Wirkungen auf das Immungeschehen. Unter Therapie mit dem IgE Antikörper Omalizumab wird eine Bindung des freien IgE und eine Downregulation der hochaffinen IgE-Rezeptors beschrieben. ( Chang et al. 2006 )

### **2.5.3. Änderung des Zytokinmilieus**

Aufgrund der Komplexität einer Immunreaktion ist es nicht möglich, alle beteiligten Zytokine zu erwähnen. Die Darstellung beschränkt sich auf die Zytokine, welche aktuell im wissenschaftlichen Interesse stehen.

Verschiedene Zytokinbestimmungen unter SLIT zeigen eine immunmodulatorische Wirkung dieser Therapie auf. Im peripheren Blut von Patienten unter Therapie mit SLIT ließen sich

dosisabhängige Effekte nachweisen. IL-10, welches über Treg-Zellen das Verhältnis von TH1/TH2 beeinflusst, wird während SLIT verstärkt exprimiert. So konnte man nach zwei Jahren Therapie einen gegenüber der Placebogruppe erhöhten IL-10 und TGF-beta Spiegel messen, während die IL-5 Expression inhibiert wurde. (Savolainen et al. 2006) Nach einer Kurzzeittherapie über 60 Tage waren ebenfalls erhöhte IL-10 und TGF-beta Spiegel messbar. (Burastero et al. 2008)

IL-4 wird von einer bisher unbekannten Zellreihe am Beginn der TH0 Differenzierung zu TH2 sezerniert und bahnt somit den atopischen TH2 Reaktionsweg. Im weiteren Verlauf wird IL-4 von den TH2 Zellen autokrin exprimiert, wirkt autostimulatorisch und B-Zell aktivierend. (Janeway et al. 2001 ) Während SLIT ist ein Rückgang des IL-4 Spiegels gut untersucht. (Wang et al. 1999 und Cheng et al. 2006 ) IL-5 wird ebenfalls von TH2-Zellen sezerniert und stimuliert B-Zellen, welche nun zur Antikörperproduktion angeregt werden. (Jutel et al. 2006) Auch hier zeigte sich in einigen Arbeiten eine messbare Reduktion der Interleukin-5 Expression unter bzw. nach sublingualer Therapie. ( Incorvaia et al. 2008 und Okano et al. 2006)

TGF-beta, welches ebenfalls von Treg Zellen gebildet wird, wirkt direkt proliferationsfördernd auf TH1 Zellen. Unter SLIT war die Expression von TGF-beta erhöht. (Bellighausen et al. 2006)

Messbare Veränderungen während SLIT sind auch für Interferon- $\gamma$  beschrieben worden.

Ciprandi beschrieb 2008 einen signifikanten IFN- $\gamma$  Anstieg nach dreimonatiger SLIT.

(Ciprandi et al. 2008) Bohle bemerkte 2007 ebenfalls einen IFN- $\gamma$  Anstieg nach einjähriger Therapie. (Bohle et al. 2007) Allerdings sind diese Ergebnisse nicht in allen Untersuchungen nachvollziehbar, die Ergebnisse werden weiterhin kritisch diskutiert. (Antunez et al. 2008) Probleme bestehen weiterhin in der mangelnden Vergleichbarkeit der Studien, da sehr heterogene Präparate zur Therapie von unterschiedlichen Sensibilisierungen verwendet werden.

#### **2.5.4 Leukozytenveränderungen**

In den letzten Jahren wurden vermehrt Untersuchungen durchgeführt, welche die Rolle der T-regulatorischen Zellen – Treg unter Immuntherapie aufklären sollten. Treg Zellen sezernieren IL-10 und TGF- $\beta$  welche die TH2 Antwort stärker als die TH1 unterdrücken , weshalb sie

auch T-Suppressorzellen genannt werden. Taylor postuliert als Ursache eine IL-10 vermittelte Hemmung der CD28 Tyrosinphosphorylierung, welches für die TH2-Antwort eine wichtige Rolle spielt. (Taylor et al. 2006) Zusätzlich wird die Expression von IgE einerseits sehr effektiv unterdrückt, andererseits die Produktion von IgG und IgA gesteigert. (Akdis et al. 2006 und Jutel et al. 2008) Die Modulation dieser CD4 und CD25 positiven Zellen stellt einen vielversprechenden Therapieansatz in der Therapie von Autoimmunerkrankheiten und Allergien dar, da sie in zentraler Position des Immungeschehens stehen.

Bohle untersuchte die Expression von Treg-Zellen und IL-10 an Birkenpollenallergikern, welche mittels SLIT behandelt wurden. Nach vier Wochen Therapie waren sowohl IL-10 als auch die Anzahl der Treg Zellen im peripheren Blut erhöht. (Bohle et al. 2007 )

### **2.5.5. Mukosale Immunantwort**

In den letzten Jahren wurde die Theorie der mukosalen Immunantwort mit nachvollziehbaren Untersuchungen untermauert und bietet einen kausalen Erklärungsansatz der Wirksamkeit einer sublingualen Immuntherapie. Pharmakokinetische Studien zeigten, dass Allergenextrakte nicht direkt von der Schleimhaut absorbiert werden, sondern lange in der Schleimhaut verbleiben. Damit ist die Reaktionszeit der Antigene mit den immunkompetenten Zellen der oralen Mukosa relativ lang. Zudem finden man in Schleimhautbiopsien der Mundhöhle weniger histaminausschüttenden Effektorzellen wie Basophile, Mastzellen etc. als in anderen Regionen. (Marucci et al. 2008 ) Dies könnte ein Grund für die gute Verträglichkeit dieser Therapieform sein. Selbst innerhalb des Cavums ist die Verteilung der DC, welche für die Prozessierung der Antigene wichtig sind, sehr heterogen. So fand man in der Gingiva die höchste Konzentration, an der Zunge und am Gaumen sehr wenige DC. (Allam et al. 2008) Für den Wirkmechanismus der Sublingualen Immuntherapie postuliert man folgendes: Nach Antigenaufnahme über die orale Mukosa werden diese von lokalen Dendritischen Zellen phagozytiert und wandern nun in regionalen Lymphknoten. Dort werden sie TH0-Zellen präsentiert. (Frati et al. 2007) Diese TH0 Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss eines speziellen Zytokinmilieus zu Treg Zellen. Die Treg Zellen unterdrücken die Proliferation von TH2 Zellen, stimulieren aber mittels IL-10 und TGF- $\beta$  die IgG und IgA Produktion der B-Zellen. (Frew et al. 2008)

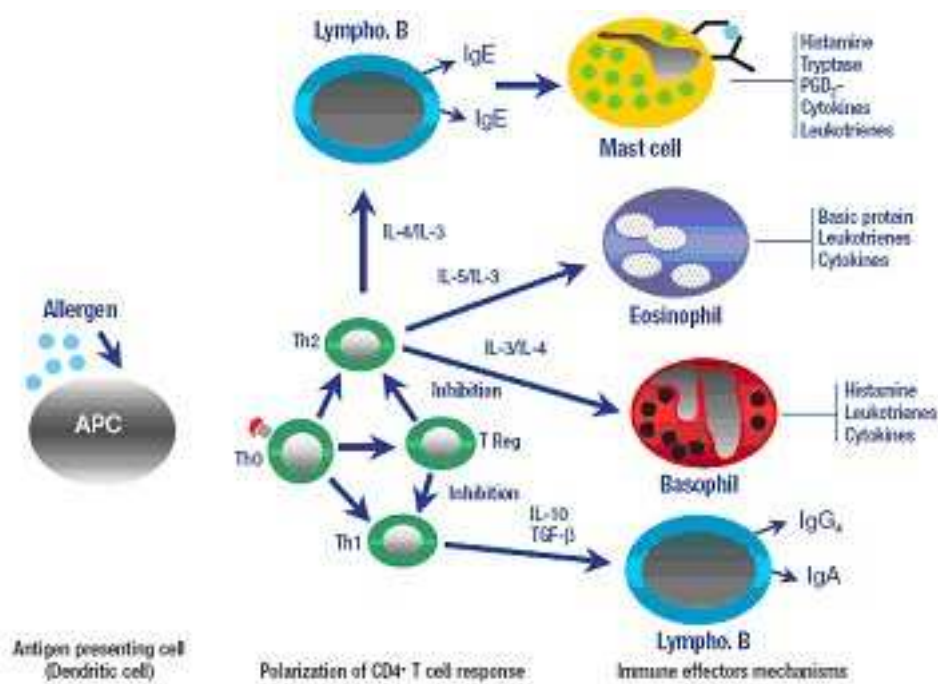


Abb. 5 Orale Toleranzmechanismen

Die Langerhansschen Zellen der Schleimhäute von Nase und Mundhöhle stehen neben den Treg Zellen im Mittelpunkt aktueller Untersuchungen. Auffällig sind die unterschiedlichen Verteilungsmuster von costimulatorischen Molekülen ( Allam et al. 2006 ) auf LHC in Mund und Nase. Auf den nasalen LHC ist eine erhöhte Expression von CD40, CD80, CD86 und erniedrigte MHC I und II Moleküle nachweisbar, während auf den oralen LHC die Anzahl von Fcεpsilon RI, einem speziellen Ig-E Rezeptor, und CD 14, einem Lipopolysaccharidrezeptor, vermehrt nachgewiesen werden kann. (Allam et al.2006)

Desweiteren wird Toll-like-receptor 4, ein mit CD14 assoziiertes Molekül, auf den oralen LHC exprimiert. (Allam et al. 2008) Dieses Molekül wird schon erfolgreich als Adjuvans zur SCIT verwandt, und könnte eine weitere wichtige Rolle in der mukosalen Immunreaktion spielen.

### **3. Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist einerseits die Effizienz der sublingualen Immuntherapie bei Allergikern anhand klinischer Daten zu untersuchen. Andererseits sollen die Laboruntersuchungen einen Teil zum Verständnis der Wirkungsweise dieser Therapieform beitragen.

Die klinisch mittels einer standardisierten Untersuchung erworbenen Daten beinhalten subjektive Scores wie Befindlichkeitsscore, Medikamentenbedarf und Asthmascore.

Außerdem wurde der international gebräuchliche FEV1 Wert zur Objektivierung der Lungenfunktion erhoben.

Die untersuchten Oberflächenmoleküle und intrazellulären Interleukine sind als Indikatoren einer Immunreaktion zu sehen. Die Betrachtung vor und während der Therapie soll erste Hinweise auf die Expression unter SLIT geben.

Abschließend ist zu erwähnen, dass aufgrund niedriger Fallzahlen zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine verbundenen Stichproben möglich waren. Diese Arbeit ist deshalb als Anwendungsbeobachtung innerhalb einer mehrjährigen Untersuchungsreihe zu werten.

Es sollte untersucht werden, wie sich die Expression von CD23, CD86, CD124, CD154, CD54, CD69, IFN- $\gamma$  und IL-2 unter SLIT verhält. Zusätzlich sollten Veränderung des Befindens anhand von Scores bezüglich des Medikamentenbedarfes, der Asthmaausprägung, des Schweregrades der Rhinitis, der Befindlichkeit, der unerwünschten Wirkungen und der FEV1 unter der SLIT verifiziert werden.

## **4. Materialien und Methoden**

### **4.1 Aufbau der Anwendungsbeobachtung**

Am Robert Koch Krankenhaus in Apolda wurden im Zeitraum vom 1.10.1999 bis 1.10.2000 die Blutproben von insgesamt 61 Kindern zwischen 6 und 18 Jahren untersucht und deren klinische Daten erfaßt. Zudem lagen aus einer Untersuchung im Vorjahr die klinischen Daten von weiteren 81 Kindern vor. Da in dieser Voruntersuchung außerdem andere laborchemische Parameter erfaßt wurden, gingen deren Ergebnisse nicht in die vorliegende Untersuchung ein.

Insgesamt lagen also für die gegenwärtige Arbeit die klinischen Daten von 142 und darin die laborchemischen Ergebnisse von 61 Kindern vor.

Die Kinder litten zu Therapiebeginn unter Allergiesymptomen, denen eine IgE-vermittelte Hypersensitivität auf Frühblüher, Gräser/Roggen oder Milbenallergenen mit unterschiedlichen Ausprägungen zu Grunde lag. Die Einschlusskriterien bezogen sich auf eine gesicherte Diagnose mit RAST-Klasse 3-6, sowie Monosensibilisierung gegenüber einem Allergen aus einer oben genannten Gruppe. Die Blutentnahme von 10 ml Vollblut fand im symptomfreien Intervall statt. Die Weiterverarbeitung der Proben fand noch am selben Tage statt, so dass lange Lagerungszeiten ausgeschlossen werden konnten.

Die Kinder wurden mit Sublivac Best® der Firma HAL behandelt. Die Behandlung dauert insgesamt mindestens 3 Jahre. Im Untersuchungszeitraum konnten 24 Kinder vor und 27 Kinder unter der Therapie untersucht werden. Die Kontrollgruppe umfasst 10 gesunde Kinder der gleichen Altersgruppe. Alle Kinder stammen aus der Umgebung von Apolda / Thüringen.

Folgende Parameter wurden erhoben:

In der allergologischen Ambulanz wurden die Kinder von Prof. Zwacka untersucht und die Resultate zu Symptomatik, Art und Menge der Zusatzmedikation und unerwünschten Wirkungen auf einem standardisiertem Datenblatt notiert. Im Labor des Institutes für klinische Immunologie in Jena wurden am Tag der Blutentnahme intrazelluläre Interleukine vor und nach unspezifischer Stimulation gemessen bzw. die extrazelluläre Bestimmung der

lymphozytären Oberflächenmarker ( CD-Determinanten) von unstimulierten Lymphozyten durchgeführt.

Da die Proben sofort verarbeitet wurden, war ein sauberes, aber nicht steriles Arbeitsumfeld nötig.

Von den Erziehungsberechtigten wurde das schriftliche Einverständnis zur Studienteilnahme eingeholt.

## **4.2. Therapie mit Sublivac®**

### **4.2.1 Sublivac®**

Sublivac Best® enthielt Allergene in standardisierter Form und war nach AU/ml (Allergy Units) bzw NE/ml (Noon Einheiten) dosiert. Weitere Inhaltsstoffe waren Glycerol, Pfefferminzöl, 6 Aminohexansäure und Natriumdihydrogenphosphat. Zugelassen sind Baum-, Gräser-, Kräuter-, Schimmelpilz-, und Tierepithelallergenlösungen für eine sublinguale Immuntherapie, SLIT.

Die Tropfen wurden täglich morgens nüchtern 2 bis 3 min unter der Zunge gehalten und danach geschluckt. Die Behandlung bestand aus einer Grundbehandlung mit den Tropfpipettenflaschen

A zu 7,5 ml, die 2000 A.U. bzw. 2000 NE/ml enthält und

B zu 10,5 ml, die 10000 A.U. bzw. 10000 NE/ml enthält.

Die Fortsetzungsbehandlung bestand aus 2 Flaschen

B zu je 12 ml Allergenlösung mit 10000 A.U./ml bzw. 10000 NE/ml

### **4.2.2 Therapieschema**

Therapiert wurde nach folgendem Schema:

#### Grundbehandlung

Flasche A

Tab.1 Dosierungsschema 1, Initialbehandlung Sublivac ©

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tropfen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

## Flasche B

Tab.2 Dosierungsschema 2, Initialbehandlung Sublivac ©

Tag	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Bis Flasche leer
Tropfen	1	2	3	4	5	5	5	5	5	5

## Fortsetzungsbehandlung

Wenn die Flasche B der Grundbehandlung aufgebraucht war, wurde ohne Verzögerung mit der Flasche B der Fortsetzungsbehandlung weitertherapiert.

## Flasche B

Tab.3 Dosierungsschema 3, Fortsetzungsbehandlung Sublivac ©

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Bis Therapieende
Tropfen	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Die Fortsetzungsbehandlung sollte nicht weniger als 3 Jahre betragen, jede Unterbrechung oder auftretende Symptomatik sofort dem behandelnden Arzt gemeldet werden.

Oben genanntes Schema soll als Richtlinie gelten und kann bei Bedarf individuell variiert werden.

## **4.3 Intrazelluläre Interleukinmessung und Extrazelluläre Lymphoytenmarker mittels FACS**

### **4.3.1 Chemikalien und Materialien**

Aqua dest.

NaHC03

DMSO( Dimethylsulfoxid)

Lysing Solution

Serva

Sigma



Cell Wash	Sigma
RPMI 1640	Bio Whiltaker
Ficoll ( 1,077 Dichte )	Biochrome KG
FACS-Glasröhrchen	Sarstedt
Spitzbodenröhrchen	Greiner
diverse Eppendorf Pipetten	

#### 4.3.2 Puffer, Antikörper, Fertigkits

Albumine Bovine Fraction V, pH 7,0	ICN Biomedical
HBSS	Gibco
Permeabilisationspuffer	Hölzel Diagnostika / Köln
0,5 ml Permeabilisator + 50 ml HBSS + 0,5 g BSA	
Fixativ	Hölzel Diagnostika / Köln
0,05% Paraformaldehyd	Sigma

#### Stimulatoren

- 1-Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)
  - Sigma, P 8139, Stammlösung zu 10 ug / 10 ul in DMSO
- 2-Ionomycin
  - Sigma, I 0634, Stammlösung zu 1mM in DMSO
- 3- Monensin
  - Sigma, M 5273, Stammlösung zu 10 mM in 100% Ethanol

Anti Human IL – 2 PE Kit	Hölzel Diagnostika / Köln
Monoklonaler Mouse anti-human, IgG1, IL-2-PE	
Anti Human IFN- $\gamma$ FITC Kit	Hölzel Diagnostika / Köln
Monoklonaler Mouse anti-human, IgG1, IFN- $\gamma$ FITC	

Monoklonaler Mouse anti-human Antikörper, IgG1 - PE :

CD23, CD54, CD69, CD86, CD124, CD154

Beckman Coulter / Brea / USA

Monoklonaler Mouse anti-human Antikörper, IgG1, FITC :

CD4, CD19

Beckman Coulter / Brea / USA

Monoklonaler Mouse anti-human Antikörper, IgG1, PerCP:

CD3

Beckman Coulter / Brea / USA

#### **4.3.3 Untersuchungsmaterial**

heparinisiertes Vollblut

#### **4.3.4 Geräte**

Becton Dickenson FacSort

Macintosh PC mit Auswertungssoftware Lysis III

#### **4.3.5 Durchführung der intrazellulären Messungen**

Ziel des Versuches war, die lymphozytäre Sekretion der jeweiligen Interleukine mittels unspezifischer Stimulation zu untersuchen. Zur Kontrolle wurden je zwei Ansätze hergestellt, wovon einer mit PMA und Ionomycin stimuliert wurde. Anschließend wurde die Sekretion mit Monesin gehemmt.

Der zweite Ansatz wurde nicht stimuliert, sondern nur mit Monesin geblockt. Anschließend wurde rechnerisch die Stimulierbarkeit als prozentuale Differenz der beiden Ansätze ermittelt. Als Ausgangsmaterial war heparinisiertes Vollblut vorhanden.

Zur Fixierung wurden 20 µl Blut mit 180 µl Kulturmedium in einem Eppendorfgefäß gemischt. Anschließend wurde das Material auf zwei Ansätze verteilt. Ansatz eins wurde 1 µl/ml der Stimulatoren 1 (PMA) – 2 (Ionomycin) und Monensin hinzugefügt und 5h in einem Begasungsschrank (5% CO<sub>2</sub>) belassen. Folgend Waschen der Lösung mit 2 ml HBSS und Zentrifugation bei 2000 U/min. Anschließend Absaugung des Überstandes. Danach

Zugabe von 500 µl des Fixativs (0,05% Paraformaldehyd) und Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min. Im Anschluß daran zweimaliges Waschen mit 1 ml HBSS. Absaugen des Überstandes nach Zentrifugation und Auffüllen mit 1ml HBSS. Nun Auffüllen mit 1ml Permeabilisationspuffer pro Ansatz, Inkubation für 15 min und nochmaliges Waschen mit HBSS. Dann Teilung der Lösung auf die einzelnen Ansätze nach folgendem Schema:

Tab. 4 Schema der intrazellulären Messung

	PerCP	FITC	PE
A	Anti-CD3	Anti-IFN $\gamma$	Anti- CD154
B	Anti-CD3		Anti – IL-2 + Streptavidin

A, B und C jeweils zwei Ansätze:

Ansatz 1 : Stimulation mit PMA, Ionomycin und Sekretionshemmung mit Monensin

Ansatz 2 : Sekretionshemmung mit Monensin

Nun werden die obigen Ansätze mit dem entsprechenden Antikörper versetzt. Es folgt das vortexen und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von Streptavidin und Goat-Anti-Mouse-Biotin erfolgt aus messtechnischen Gründen um eine Verstärkung der Signale zu erhalten. Schließlich zweimaliges Waschen der Lösung mit je einem Milliliter CellWash, Zentrifugation und in 200 µl CellWash lösen und anschließende sofortige Messung im FACS-Gerät.

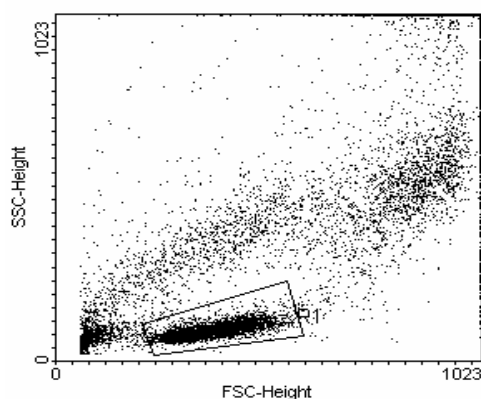


Abb.6 Abgrenzung von Zellfraktionen mittels Durchflusszytometrie.

Mittels der Vorwärtstreuung des Lichts (FSC – Forward Scatter) wird die Zellgröße ermittelt. Die Seitwärtstreuung (SSC- Sideward Scatter) korreliert mit der Granularität / Plasma-Kernrelation und lässt damit eine Differenzierung der Lymphozyten zu.

Mit diesem Verfahren lassen sich die verschiedenen Lymphozytensubtypen unterscheiden. In diesem Falle werden die Lymphozyten, welche relativ klein sind und wenig Granula besitzen mittels eines „Gates“ grafisch von den anderen Zellen separiert und weiter untersucht.

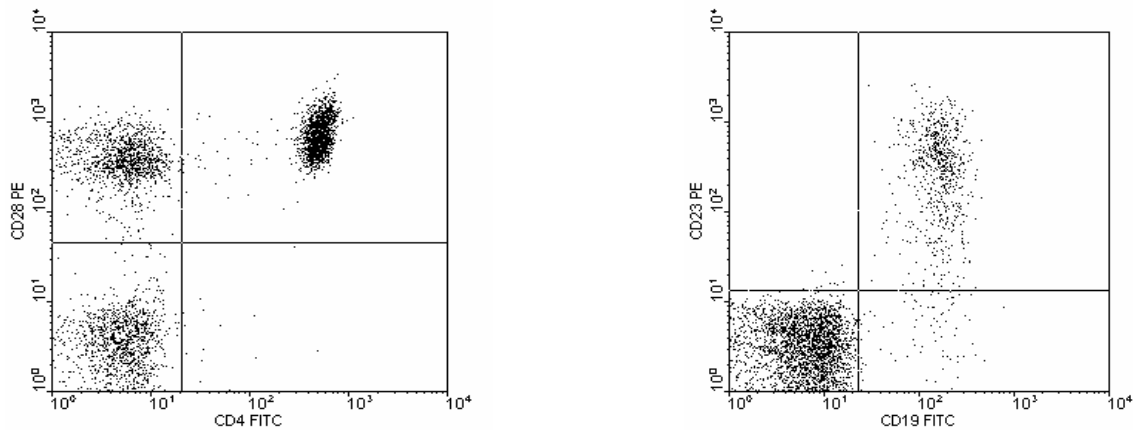


Abb. 7a und b „Dot-Plot“ 2-Farben Analyse

Weitere Differenzierung der Lymphozyten erfolgt mittels spezifisch markierter Antikörper. CD4 Antikörper bindet an T-Lymphozyten, CD19 an B-Lymphozyten. Der zu untersuchende Antikörper befindet sich in diesem Falle auf der y-Achse, also CD28 auf der T-Zelle (Abb.7a) und CD23 auf der B-Zelle (Abb. 7b)

#### 4.3.6 Bestimmung der extrazellulären Lymphozytenmarker

Ausgangsmaterial war ebenfalls heparinisiertes Vollblut.

Dies wird mittels Zentrifugation in die zellulären Bestandteile und den Plasmaüberstand getrennt. Der zelluläre Anteil wird anschließend mit 2 ml RPMI versetzt.

Zur Bestimmung der extrazellulären lymphozytären CD-Determinaten werden zunächst die Lymphozyten mittels Ficoll-Dichtegradienten separiert. Hierzu werden 2 ml Ficoll in ein Spitzbodenröhrchen gegeben. Nun wird die Blut-RPMI Suspension vorsichtig auf das Ficoll pipettiert. Danach erfolgt die Zentrifugation für 15 min bei 2500 U/min. Aufgrund des größten Dichtegradienten setzen sich die Erythrozyten im Spitzbodenröhrchen ganz unten ab. Es folgt eine Schicht Ficoll, dann die mononukleären Zellen und oben eine Schicht RPMI. Die mononukleären Zellen werden vorsichtig abpipettiert und dreimal mit 5 ml RPMI gewaschen und mit 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert.

Das Plasma wird für weitere Messungen eingefroren. Die separierten Lymphozyten werden dann mit 1 ml RPMI versetzt. Davon wurden 100 µl mit je 5 µl Antikörper nach folgendem Schema versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert.

Tab. 5 Schema zur Laborbestimmung der extrazellulären CD

	PE	FITC
1.	CD23	CD19
2.	CD86	CD19
3.	CD124	CD19
4.	CD40 Lig.	CD4
5.	CD54	CD4
6.	CD69	CD4

Darauf wird zur Fixierung 250 µl Paraformaldehyd zugegeben. Die Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgt sofort im Anschluss.

#### 4.4 Kurzübersicht der gemessenen Parameter

CD3, ein Transmembranprotein, wird von T-Zellen exprimiert und bildet zusammen mit dem T-Zellrezeptor einen Komplex, welcher zur Aktivierung von T-Zellen führen kann.

CD4, ein membranständiger Korezeptor der T-Helferzelle, bedingt die Interaktion der T-Helferzelle mit MHC Klasse II Molekülen, über welche vorwiegend exogene Antigene präsentiert werden.

CD19, ein Membranprotein, welches als Corezeptor auf B-Lymphozyten typisch ist.

CD23 ist ein niedrigaffiner IgE Rezeptor, welcher auf B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen, Dendritischen Zellen und einigen Thymuszellen exprimiert wird.

CD54 wird auch als ICAM-1 bezeichnet. Diese Bezeichnung beschreibt dessen Funktion als interzelluläres Adhäsionsmolekül. Es lässt sich auf antigenpräsentierenden Zellen und Endothelzellen nachweisen

CD69 wird an der Oberfläche aktivierter T-Zellen, Langerhanschen Zellen und B-Zellen exprimiert. Auf der T-Zelle stellt es einen Marker der frühen Aktivierungsphase dar.

CD86, ein Eiweißmolekül, welches ausschließlich auf Zellen vorkommt, die T-Zellen aktivieren können, ist ein notwendiges Signal zur Stimulation von naiven T-Zellen.

Als CD124 wird ein Transmembranprotein bezeichnet, welches auf der B-Zelle die IgE Expression begünstigt und an der T-Zelle die Immunantwort zugunsten der TH2 Antwort steuert.

CD154, auch als CD40-Ligand bezeichnet kommt hauptsächlich auf T-Helferzellen vor. Das System CD40 / CD154 steht an zentraler Stelle der Interaktion zwischen B und T Lymphozyten

Das Glycoprotein IFN $\gamma$  hemmt die TH2 und begünstigt die TH1 Antwort.

IL-2, ein Zytokin fördert die klonale Expansion der TH1 Zelle mittels autokriner Stimulation.

## **4.5 Klinische Datenerhebung**

Der klinischen Daten wurden standardisiert vom Team des Robert – Koch - Krankenhauses unter Leitung von Prof. Zwacka erhoben, und mit den Blutproben an uns weitergeleitet.

## **4.6 Datenauswertung und Statistik**

Zur Auswertung der FACS Messungen stand ein Macintosh PC mit der Software Lysis III zur Verfügung. Anschließend wurden die Werte in das Programm WinMDI für Windows übertragen und standardisiert ausgewertet. Die Statistiken wurden mit Hilfe des Institutes für Medizinische Informatik und dem Programm SPSS für Windows in der Version 15.01 erstellt.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Klinische Daten**

Insgesamt wurden 142 Datensätze ausgewertet. Davon befanden sich 53 Patienten vor Einleitung der Therapie und 89 unter der Therapie. Die Daten von 81 Patienten stammen aus einer Untersuchung des Vorjahres, die Erhebung erfolgte nach den gleichen Kautelen. Die Auswertung der klinischen Daten mittels Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben ergab folgende Werte.

#### **5.1.1 Befindlichkeitsscore**

Das Befinden wurde auf einer Skala von 1 bis 4 eingeschätzt; wobei 1 sehr gut, 2 gut, 3 befriedigend, 4 schlecht entsprach. In der Auswertung der unverbundenen Stichproben ergaben sich folgende Ergebnisse:

Vor der Therapie klassifizierten nur 5,7 % der Probanden ihr Befinden als sehr gut, und 41,5 % als gut. Unter Therapie hingegen stuften 47,5 % ihr Wohlbefinden als sehr gut, 41,6 % als gut ein. Zusammengerechnet ergibt sich daraus ein sehr gutes oder gutes Befinden vor Therapie von 47,2 %, nach Therapie hingegen 88,8 %. Also eine Verbesserung um 47,6 %. Zudem verringerte sich unter der SLIT- Behandlung der Anteil der Patienten, welche ihre Befindlichkeit als schlecht einstufen um 14% von 15,1% auf 1,1%.

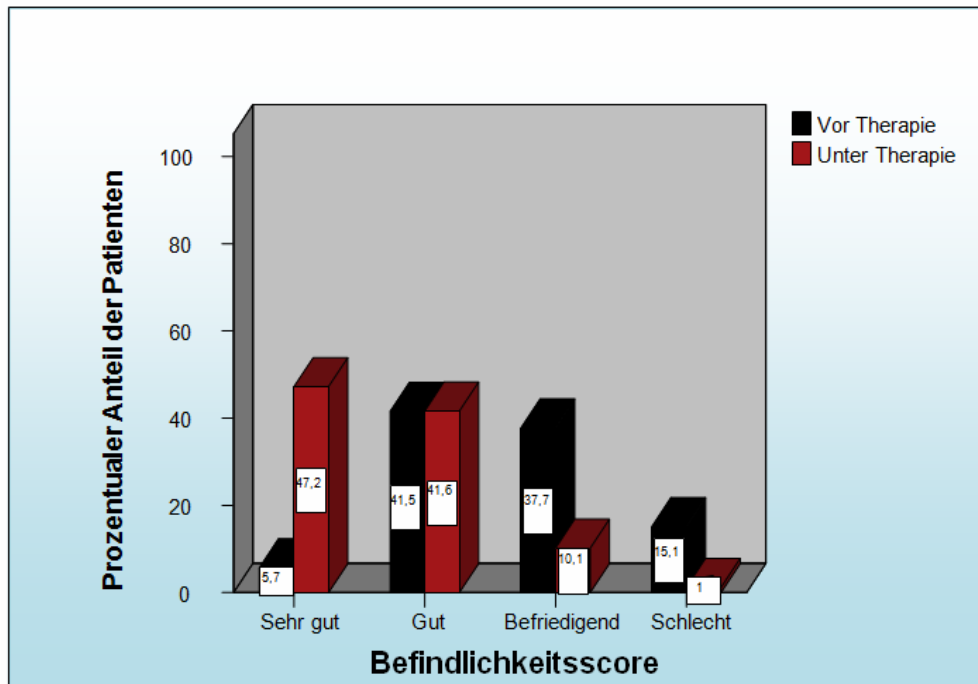


Abb. 8 Vergleich der subjektiven Befindlichkeit vor und unter der Therapie.  
1 = sehr gut bis 4 = schlecht bei n = 53 vor Therapie und n = 89 unter Therapie

Tab.6 Befindlichkeitsscore vor und unter Therapie

		Befindlichkeitsscore				Gesamt
		1	2	3	4	
Vor Therapie	Anzahl	3	22	20	8	53
	%	5,7%	41,5%	37,7%	15,1%	100,0%
Unter Therapie	Anzahl	42	37	9	1	89
	%	47,2%	41,6%	10,1%	1,1%	100,0%
Gesamt	Anzahl	45	59	29	9	142
	%	31,7%	41,5%	20,4%	6,3%	100,0%

### 5.1.2 Rhinitisscore

Der Schweregrad der atopischen Rhinitis wurde anhand eines Scores von Prof. Zwacka quantifiziert. Dieser reichte von 0, keine Symptome, 1, leichte Symptome, 2 mittlere Symptome bis zu 3, schwere Symptome. Es zeigte sich, dass vor Therapiebeginn nur 3,8 % symptomfrei waren und 9,4 % über leichte Symptome klagten. Im Gegensatz dazu gaben 41,5 % vor Therapie schwere Symptome an. Unter der Therapie hingegen waren 30,8% beschwerdefrei, 38,5% klagten über lediglich leichte Symptome. Die Anzahl derer Probanden mit schweren Symptomen betrug unter laufender Therapie lediglich 6,6 %.



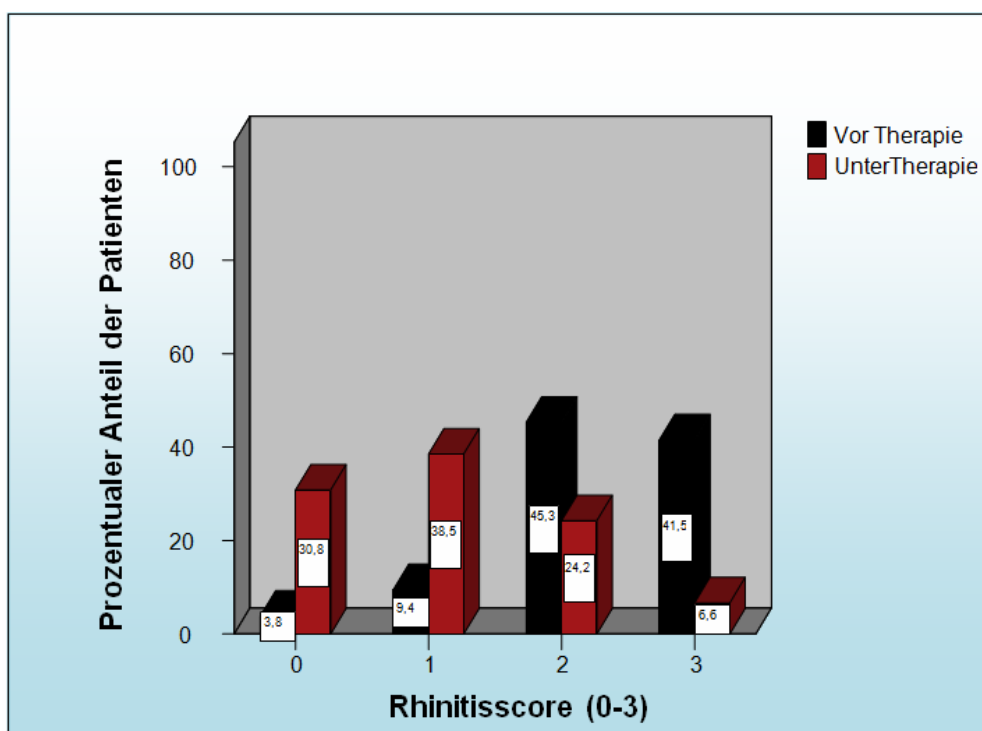


Abb. 9 Ausprägung des Rhinitisscores vor Beginn der Therapie ( n=53) und während der Behandlung mit SLIT ( n=91 ) 0 = keine Symptome bis 3 = schwere Symptome

Tab. 7 Rhinitisscore vor und während der Therapie

		Rhinitisscore (0-3)				Gesamt
		0	1	2	3	
Vor Therapie	Anzahl	2	5	24	22	53
	%	3,8%	9,4%	45,3%	41,5%	100,0%
Unter Therapie	Anzahl	28	35	22	6	91
	%	30,8%	38,5%	24,2%	6,6%	100,0%
Gesamt	Anzahl	30	40	46	28	144
	%	20,8%	27,8%	31,9%	19,4%	100,0%

### 5.1.3 Medikamentenbedarf

Der supportive Medikamentenbedarf wurde erfasst und quantifiziert. Auch unter der Betrachtung des Medikamentenbedarfs lassen sich Rückschlüsse bezüglich einer Verbesserung des Patientenbefindens ziehen. Vor Beginn der Therapie gaben 45,2 % der Probanden an, oft und 38,1%, permanent auf Medikamenteneinnahme zur Symptombesserung angewiesen zu sein. Unter Sublingualer Immuntherapie nahmen 30 % gar keine Medikamente mehr ein. 56,1% griffen nur noch gelegentlich zu Arzneimitteln um Besserung zu erlangen.

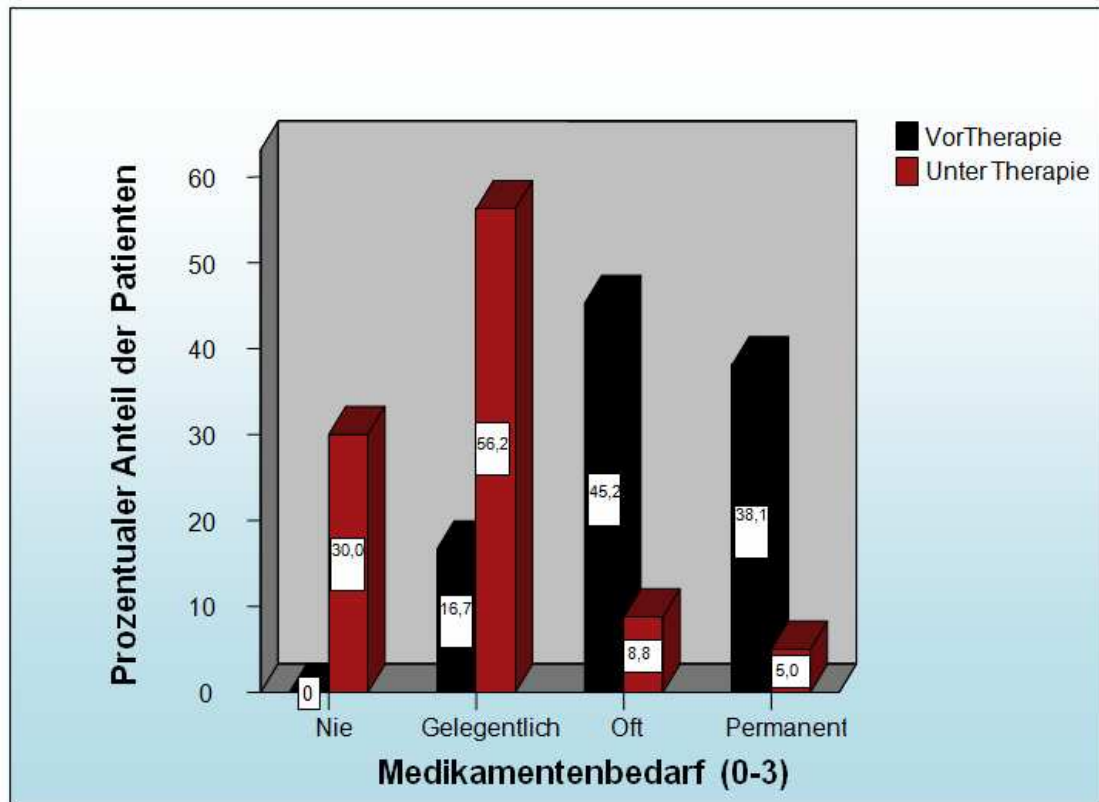


Abb. 10 Medikamentenbedarf vor ( n= 42) und während Sublingualer Immuntherapie ( n=80 ) 0 = Nie, 1 = Gelegentlich, 2 = Oft, 3 = Permanent

Tab. 8 Medikamentenbedarf vor und unter Therapie

			Medikamentenbedarf (0-3)				Gesamt
			0	1	2	3	0
Vor Therapie	Anzahl		0	7	19	16	42
	%		,0%	16,7%	45,2%	38,1%	100,0%
Unter Therapie	Anzahl		24	45	7	4	80
	%		30,0%	56,3%	8,8%	5,0%	100,0%
Gesamt	Anzahl		24	52	26	20	122
	%		19,7%	42,6%	21,3%	16,4%	100,0%

#### 5.1.4 Asthmaausprägung

Ein eindeutiger Trend ist auch nach der Auswertung des Scores bezüglich der Ausprägung der asthmatischen Symptome zu erkennen. So gaben vor Therapiebeginn nur 31,8% an, unter intermittierendem asthmatischen Beschwerden zu leiden. Unter Therapie erhöhte sich der prozentuelle Anteil der Patienten mit intermittierenden Leiden auf 59 %. Die Probanden, welche vorher über persistierendes leichtes Asthma klagten, reduzierte sich von 31,8% auf

19,3%. Der Anteil, welcher an persistierendem mittelgradigen Asthma litten, verringerte sich von 20,5 auf 3,6 %.

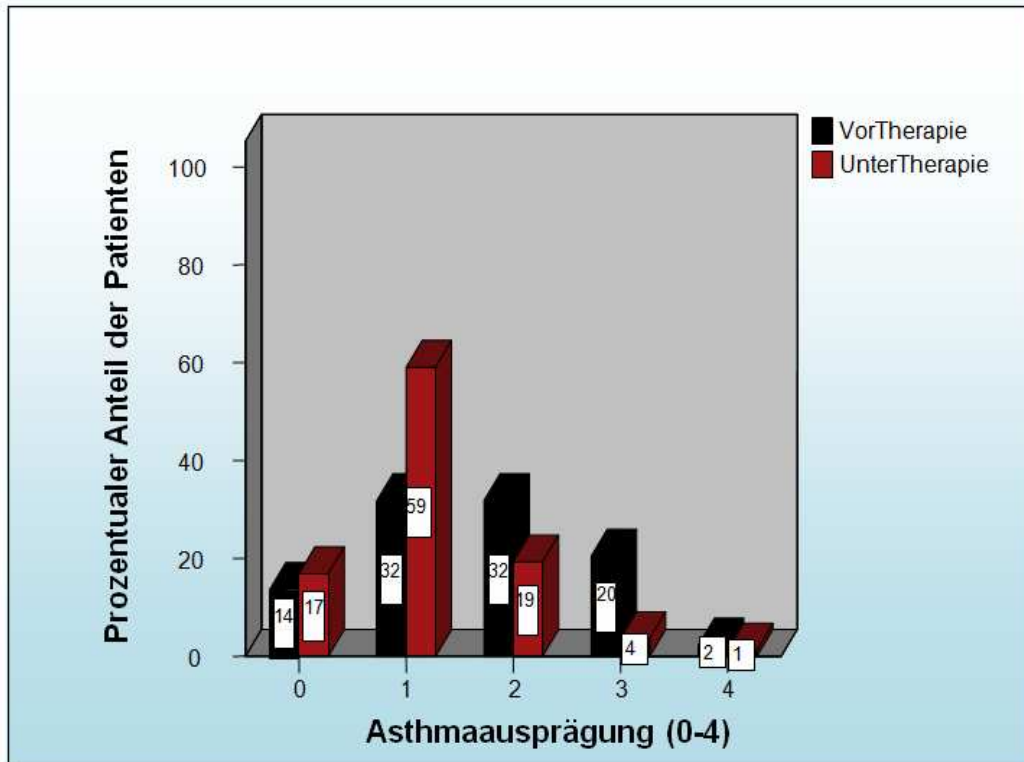


Abb.11 Asthmaausprägung vor ( n=44 ) und während ( n=83 ) der SLIT  
 0 keine asthmatischen Symptome 1 Intermittierendes Asthma  
 2 Persistierendes leichtes Asthma 3 Persistierendes mittelgradiges Asthma  
 4 Persistierendes schweres Asthma

Tab.9 Asthmascore vor und während SLIT

		Asthma (0-4)					Gesamt
		0	1	2	3	4	0
Vor Therapie	Anzahl	6	14	14	9	1	44
	%	13,6%	31,8%	31,8%	20,5%	2,3%	100,0%
Unter Therapie	Anzahl	14	49	16	3	1	83
	%	16,9%	59,0%	19,3%	3,6%	1,2%	100,0%
Gesamt	Anzahl	20	63	30	12	2	127
	%	15,7%	49,6%	23,6%	9,4%	1,6%	100,0%

### 5.1.5 FEV 1

Die Untersuchung der Forcierten Einsekundenkapazität ergab eine deutliche Verschiebung des Beschwerdemusters. Während vor Therapiebeginn keiner der Patienten in der

Lungenfunktionsprüfung eine FEV1 größer als 100 % erreichte, änderte sich der Anteil unter Therapie auf 11,3 %. Eine FEV zwischen 90 % und 80 % wurde vor Therapie bei 18%, unter Therapie bei 40,6 % gemessen. Die Häufigkeit der Werte zwischen 80% und 90 % verringerten sich unter Behandlung von 17,3 auf 8,3 %. Werte kleiner als 80% als Zeichen einer schweren pulmonalen Obstruktion wurden vor Therapie bei 3 und unter mit 1,5% ermittelt.

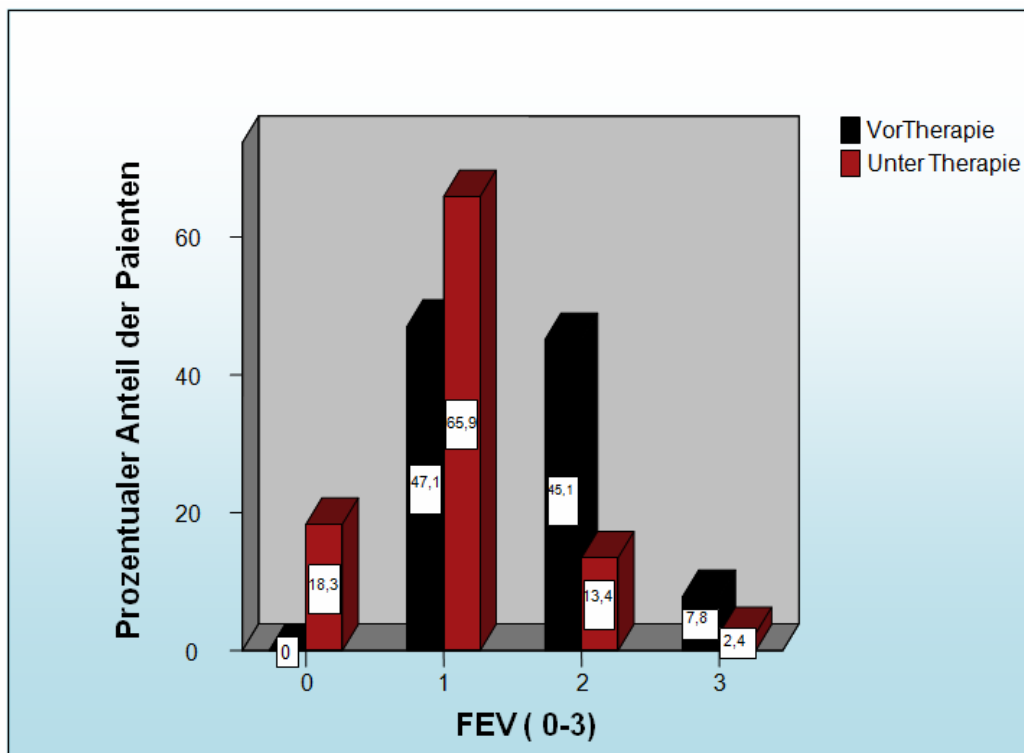


Abb. 12 Entwicklung der Forcierten Einsekundenkapazität FEV1 unter SLIT  
FEV1 vor ( n =51 ) und während ( n=82) der SLIT  
0 > 100 %, 1 < 100 %, 2 < 90 %, 3 < 80 %

Tab.10 FEV1 vor und während SLIT Therapie

		FEV ( 0-3)				Gesamt
		0	1	2	3	
Vor Therapie	Anzahl	0	24	23	4	51
	%	0%	18,0%	17,3%	3,0%	38,3%
Unter Therapie	Anzahl	15	54	11	2	82
	%	11,3%	40,6%	8,3%	1,5%	61,7%
Gesamt	Anzahl	15	78	34	6	133
	%	11,3%	58,6%	25,6%	4,5%	100,0%

### 5.1.6 Unerwünschte Wirkungen

Von insgesamt 140 Studienteilnehmern wurden Bemerkungen zu Nebenwirkungen der Sublingualen Immuntherapie angegeben. Mehr als 90,7 % bemerkten keinerlei unerwünschte Wirkung. 7,85 % klagten über milde lokale Symptome und 1,42 % über Nebenwirkungen, die den Krankheitssymptomen entsprachen.

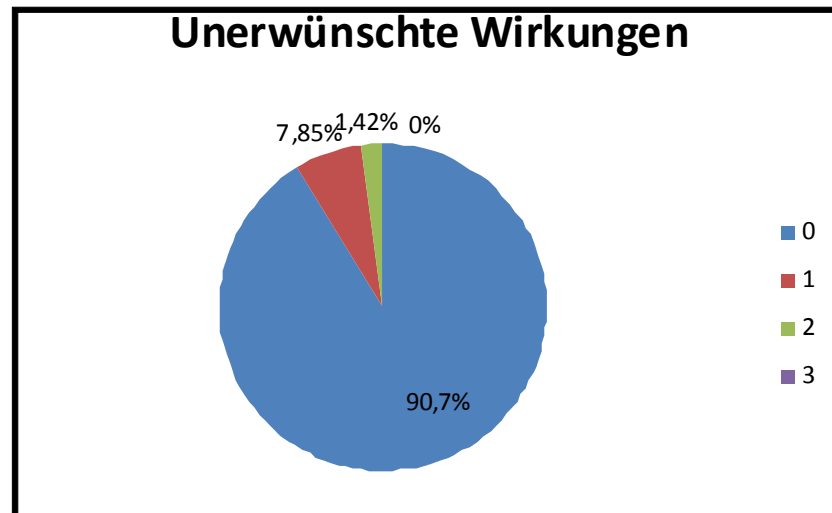


Abb.13 Unerwünschte Wirkungen der SLIT  
0 = keine, 1 = lokale NW, 2 =Symptome der Grunderkrankung, 3 = Schock

Tab.11 Verteilung der unerwünschten Wirkungen vor und unter Therapie

			Nebenwirkungen (0-3)			Gesamt
			0	1	2	0
		%	90,7%	7,85%	1,42%	100,0%
Gesamt		Anzahl	127	11	2	140

## 5.2 Immunologische Parameter

Die im Rahmen dieser Datenanalyse verwendeten Ergebnisse mussten als unverbundene Stichproben ausgewertet werden, da zum Zeitpunkt der Datenerhebung noch keine ausreichende Datenlage für eine verbundene Stichprobenanalyse gegeben war. In den folgenden Untersuchungsjahren wurde dies mittels kontinuierlicher Erhebung und Auswertung von Patientendaten ermöglicht. Die Analyse der Daten wurde mittels Mann-

Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, da keine Normalverteilung der Werte vorlag. Das Signifikanzniveau wurde auf  $P < 0,05$  festgelegt. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden zudem die Mediane berechnet und miteinander verglichen.

## 5.2.1 Vergleich extrazellulärer Lymphozytenmarker auf Lymphozyten der B-Zell-Reihe vor und unter SLIT mit denen gesunder Kontrollen

### 5.2.1.1 CD23

Die Auswertung der Expression von CD23 ergab für die Allergiker vor Beginn der Sublingualen Immuntherapie einen Median von 84,5% positiver Zellen.

Im Vergleich dazu war die Expression der Studiengruppe unter Therapie mit 78,9% nicht signifikant ( $p = 0,19$ ) geringer und lag im Meßbereich der Kontrollgruppe, in welcher 78,3 positive Zellen gemessen wurden.

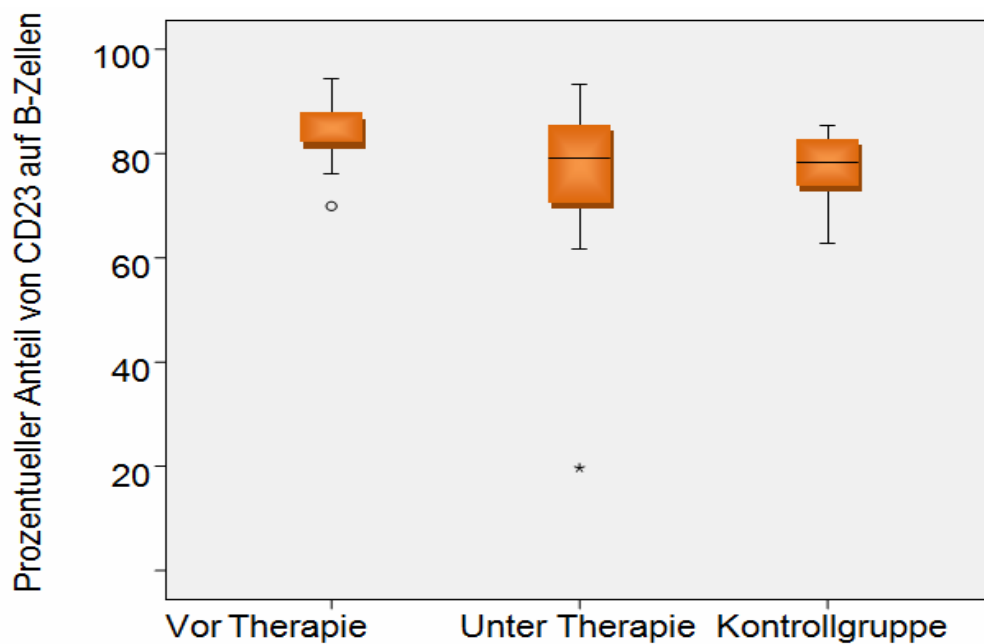


Abb.14 Prozentuale lymphozytäre CD23 Expression vor (n=20) unter (n=27) Immuntherapie und bei gesunden Kontrollen

Tab.12 CD23 Expression im Therapieverlauf

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	84,6	24	5,3	84,5
Unter	76,8	27	14,2	78,9
Kontrolle	76,9	10	7,0	78,3

### 5.2.1.2 CD86

Die Expression des Oberflächenmarkers CD86 war in den Patientenkollektiven vor und unter Therapie ähnlich ausgeprägt. Die Mediane betrugen 13,5 vor bzw. 11,9 unter SLIT. In der Kontrollgruppe wurde ein Median von 7,5 festgestellt, allerdings mit einer sehr weiten Streuung der Messwerte. Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

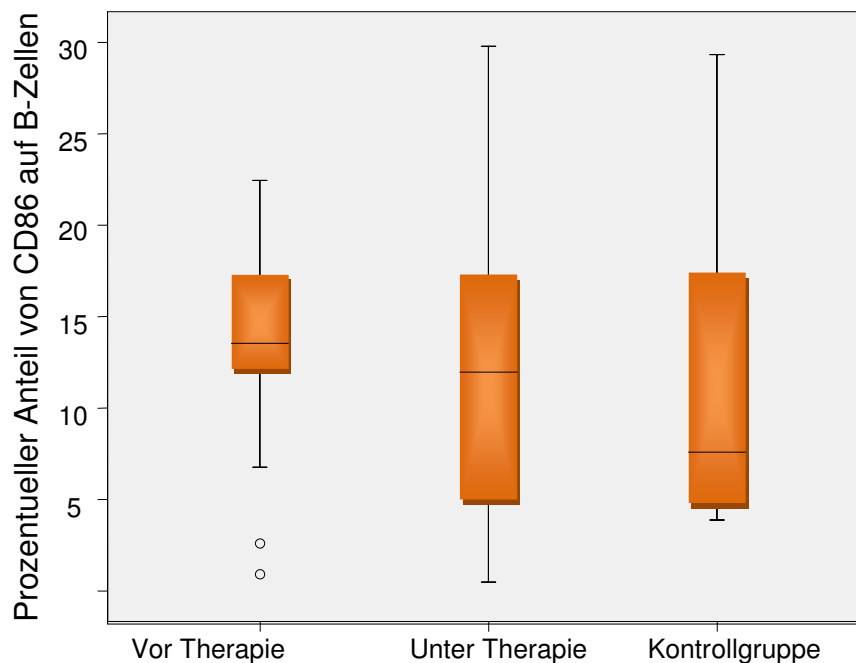


Abb. 15 Ausprägung der CD86 Expression in Prozent vor Therapiebeginn (n=23), unter SLIT (n=24) und einer gesunden Kontrollgruppe (n=10)

Tab.13 CD86 Expression vor und unter Therapie	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	13,5	24	5,5	13,5
Unter	11,7	27	8,0	11,9
Kontrolle	11,5	10	8,7	7,5

### 5.2.1.3 CD124

Die Auswertung der Daten bezüglich des IL-4-Rezeptors CD124 ergab folgendes: Unter Sublingualer Immuntherapie verringerte sich die Expression signifikant ( $p=0,005$ ). Der Median der Messwerte vor Therapiebeginn betrug 18,1. Unter Therapie hingegen 8,8. Währenddessen sich in der Kontrollgruppe der Gesunden lediglich ein Median von 4 eruieren ließ.

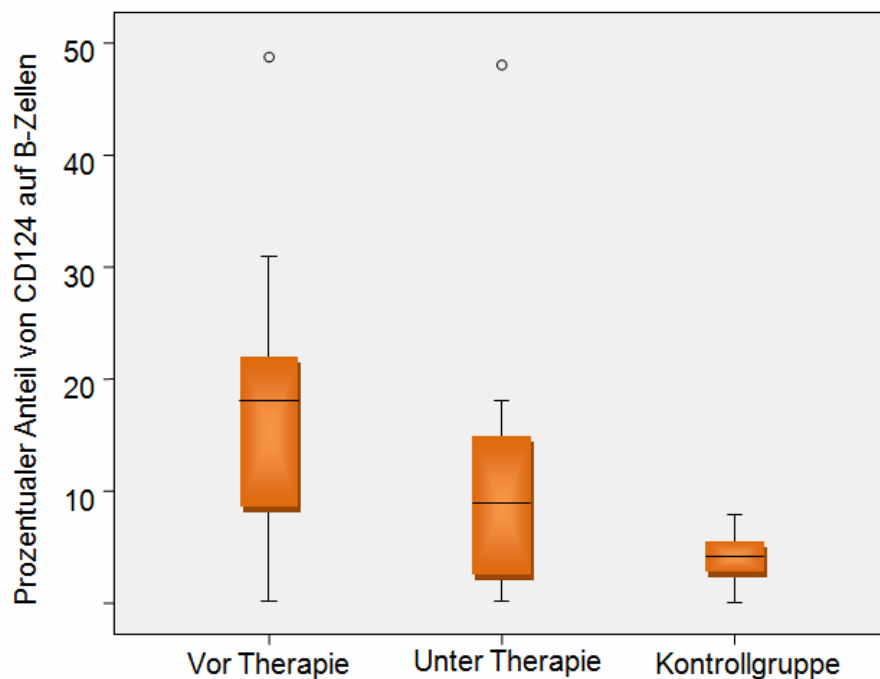


Abb. 16 CD124 auf B-Zellen während und vor SLIT



Tab.14 CD-124 Expression auf B-Zellen

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	17,1	24	10,9	18,1
Unter	10,2	26	9,9	8,8
Kontrolle	4,3	10	2,3	4,0

## 5.2.2 Vergleich extrazellulärer Lymphozytenmarker auf Lymphozyten der T-Zellreihe vor und unter SLIT mit denen gesunder Kontrollen

### 5.2.2.1 CD154

Die Auswertung der Meßergebnisse des extrazellulären CD154 ( CD40 Ligand ) erbrachte folgendes: Unter Therapie ist ein eindeutiger Trend zu niedrigeren Werten zu erkennen. Während der Median von CD154 vor Therapiebeginn 1,2 betrug, kann man unter Therapie einen Rückgang auf 0,7 beobachten. Dieser Wert deckt sich annähernd mit dem der Kontrollgruppe. In dieser Betrag der Median 0,7. Allerdings war dieser Unterschied mit 0,5 nicht signifikant.

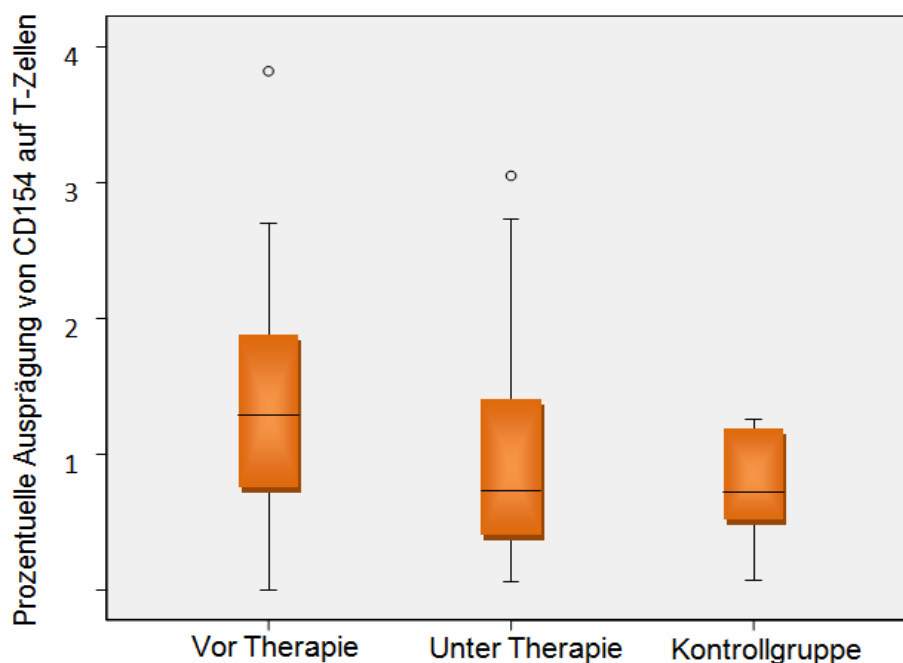


Abb. 17 Vergleich der prozentuale Expression von CD154 auf T-Zellen

Tab.15 Statistik der CD154 Expression auf der T-Zelle

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	1,4	24	0,9	1,2
Unter	,9	27	0,7	,7
Kontrolle	,7	10	0,3	,7

#### 5.2.2.2 CD54

Die Datenanalyse von CD54 vor bzw. unter Sublingualer Immuntherapie erbrachte folgende Messwerte. Es stellte sich heraus, dass während der Behandlung mit 2,1 ein höherer Median als vor der Erstgabe des Studienmedikamentes ermittelt werden konnte. Dieser war mit 1,7 zwar tendenziell niedriger, aber mit  $p=0,62$  nicht signifikant.

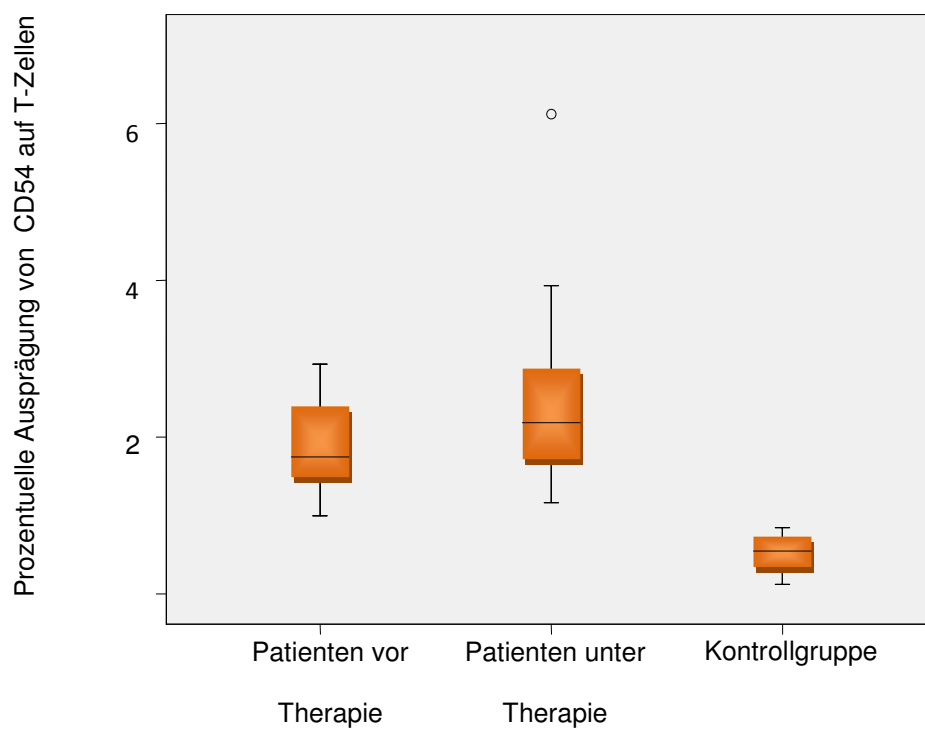


Abb. 18 CD54 Expression auf T-Zellen in Prozent vor und während SLIT

Tab. 16 Mittelwerte der CD54 Expression

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	1,8	23	0,5	1,7
Unter	2,4	27	1,0	2,1
Kontrolle	0,5	10	0,2	,5

### 5.2.2.3 CD69

Die folgende Tabelle und Grafik zeigt die Veränderung der extrazellulären CD69 Expression. Vor Beginn der Behandlung ergibt sich rechnerisch ein Median von 2,9. Unter konsequenter Therapie ist hingegen nur ein Median von 1,9 zu ermitteln. In der Kontrollgruppe der nichtatopisch veranlagten Kinder ergibt sich ein Median von 1,3. Der Rückgang unter Therapie ist mit  $p = 0,14$  signifikant.

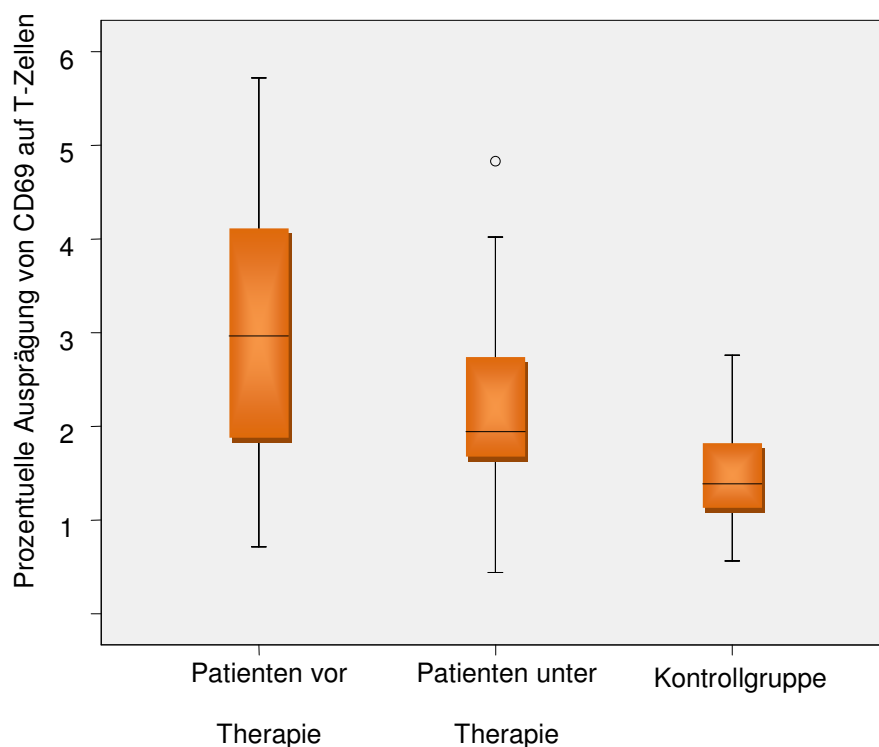


Abb. 19 T-Zell Expression von CD69 unter SLIT in Prozent

Tab.17 Statistik von CD69 auf T-Zellen während SLIT

	Mittelwert	N	Standard- abweichung	Median
Vor	3,1	24	1,3	2,9
Unter	2,1	27	1,0	1,9
Kontrolle	1,4	10	0,6	1,3

### **5.2.3 Vergleich und Stimulierbarkeit intrazellulärer Interleukine in CD3 positive Lymphozyten vor und unter SLIT mit denen gesunder Kontrollen**

#### **5.2.3.1 IFN- $\gamma$**

Die Expression des Interferons- $\gamma$  wurde jeweils vor und nach unspezifischer Stimulation mit PBMC gemessen und aus den Werten die prozentuale Veränderung errechnet. Unter Therapie betrug der Median dieser Veränderung 5,0, während dieser vor Therapie lediglich bei 3,2 lag. Dieser Unterschied weist auf einen deutlichen Therapieeffekt hin und ist mit  $p = 0,02$  auch signifikant. Die Lymphozyten der Kontrollgruppe wiesen einen Rückgang der Interferonexpression um 4,3 im Mittelwert auf.

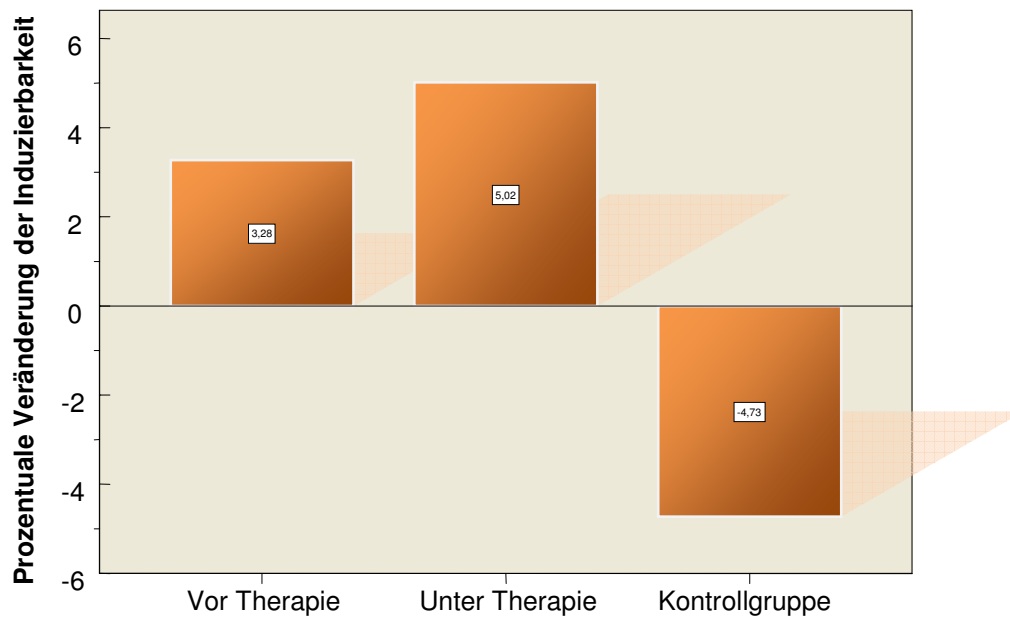


Abb.20 Intrazelluläre Interferon- $\gamma$  Sekretion nach unspezifischer Stimulation unter SLIT, vor Therapiebeginn und einer gesunden Kontrollgruppe

Tab. 18 Veränderung der Interferon- $\gamma$  Sekretion nach unspezifischer Stimulation

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	3,5	23	1,1	3,2
Unter	6,4	27	3,5	5,0
Kontrolle	-4,3	10	3,5	-4,7

### 5.2.3.2 CD154

Während die Expression von CD154 in der Kontrollgruppe ( Median 1,1 ) und den Probanden unter Therapie ( 0,6 ) kaum stimuliert werden konnte, betrug die Steigerung in der Gruppe vor Therapie im Median 10,8 %. Diese Veränderung während der Therapie ist auf einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  mit  $p = 0,00$  signifikant.

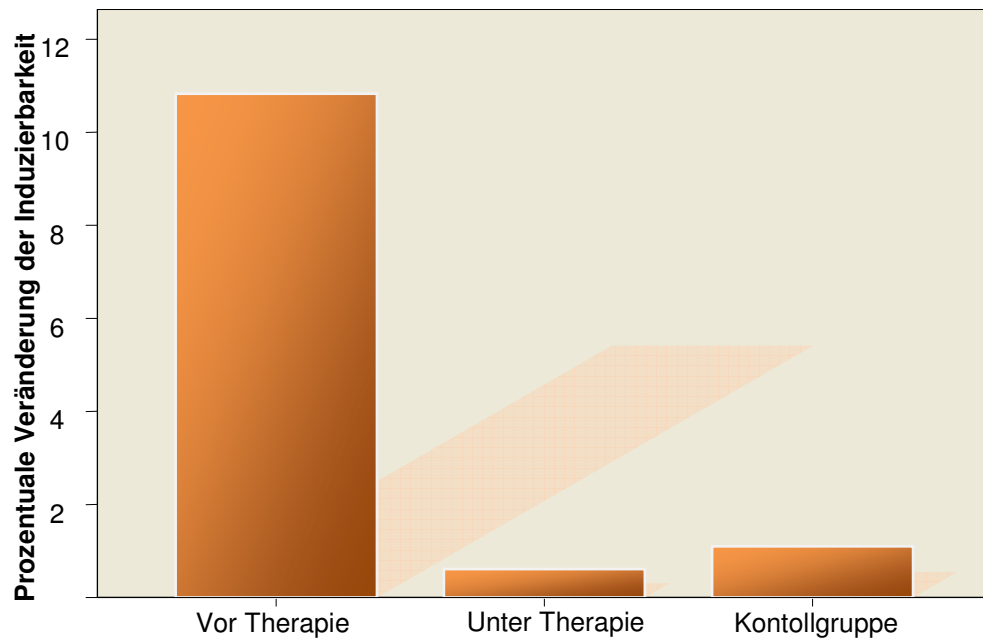


Abb. 21 Expression der intrazellulären CD154 Sekretion nach unspezifischer Stimulierung: vor Therapie, während SLIT und einer gesunden Kontrollgruppe

Tab.19 Mittelwerte und Standardabweichung der CD154Expression

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	10,5	23	4,3	10,8
Unter	-,6	27	7,8	,6
Kontrolle	,9	10	,7	1,1

### 5.2.3.3 Interleukin 2

Die intrazelluläre Produktion von IL-2 wies ebenfalls signifikante Effekte auf. So betrug die prozentuale Steigerung mittels unspezifischer Stimulation vor Therapie lediglich 0,8 % (Median) Unter Behandlung konnte eine IL-2 Induzierbarkeit von 14% gemessen werden, was wiederum mit  $p = 0,00$  einer Signifikanz entspricht.

Die Kontrollgruppe fiel mit einem Rückgang der IL-2 Induzierbarkeit um 6 % auf.

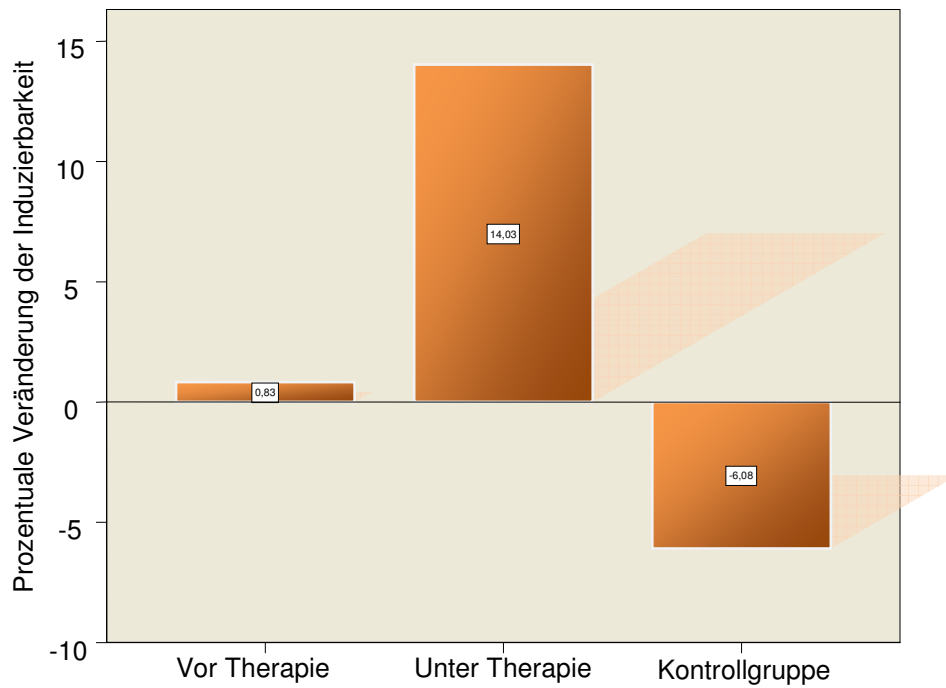


Abb. 22 Induzierbarkeit der lymphozytären intrazellulären IL-2 Expression vor ,während SLIT und einer gesunden Kontrollgruppe

Tab. 20 IL-2 Veränderung nach unspezifischer Stimulation vor und während Therapie und bei gesunden Probanden

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Median
Vor	1,1	23	1,0	,8
Unter	14,7	27	4,5	14,0
Kontrolle	-6,3	10	3,3	-6,0

## 6. Diskussion

Der Leidensdruck eines großen Teiles der Bevölkerung und die Möglichkeit einer kausalen Therapie verlangen neben der Entwicklung neuer Therapieansätze genaue Untersuchung und Evaluierung der vorhandenen therapeutischen Möglichkeiten, soweit dies noch nicht geschehen ist.

Die sublinguale Immuntherapie wird seit einigen Jahren mit Erfolg angewandt, wobei der genaue Wirkmechanismus immer noch nicht ganz geklärt ist. Diese Untersuchung soll dazu beitragen einem Erklärungsansatz einen Schritt näher zu kommen, beziehungsweise den klinischen Therapieerfolg auch objektiv laborchemisch zu untermauern. Damit die Behandlungsstrategie der Sublingualen Immuntherapie künftig auch in kinderheilkundliche Therapieleitlinien integriert werden kann, besteht eine moralisch-ethische Verpflichtung für den Unbedenklichkeitsnachweis und die Wirksamkeit im pädiatrischen Bereich. Es zeigten sich keine ernsthaften Nebenwirkungen, gelegentliche lokale Schleimhautreizungen waren passager. Das Befinden der Patienten unter Therapie wurde in allen untersuchten Parametern als subjektiv verbessert angesehen. Auch einige Laborparameter weisen auf einen Therapieeffekt hin.

Erst im vergangenen Jahr nahm die Britische Gesellschaft für Allergie und Klinische Immunologie ( British Society for Allergy and Clinical Immunology ) die SLIT als wirkungsvolle Therapie zur Behandlung von allergischer Rhinitis und allergischem Asthma in ihre Leitlinien auf. (Scadding et al. 2008)

Aktuelle Untersuchungen einer Bonner Forschungsgruppe um Prof. Novak beschäftigen sich mit einem Modell, welchem eine orale Toleranzentwicklung der Mundschleimhaut zugrunde liegt. Hierbei stehen z.B. auch eine Subpopulation der T-Zellen, sogenannte T-regulatorische Zellen im Mittelpunkt der Untersuchungen. Eine vor kurzem von Frew veröffentlichte Übersichtsarbeit zur SLIT im New England Journal unterstreicht die Aktualität dieser Thematik. (Frew 2008)

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung dieser Anwendungsbeobachtung lagen noch keine validen Erkenntnisse über Veränderungen der oralen Mukosa vor. Die Forschung konzentrierte sich darauf, Veränderungen in der Expression von Interleukinen, Antikörpern und anderen Laborparametern im peripheren Blut zu finden. Trotzdem fließen diese Erkenntnisse in die aktuellen Vorstellungen und Theorien mit ein, da sich durchaus einige Ergebnisse mit dem aktuellen Erklärungsansatz der Wirksamkeit vereinbaren lassen. So ist auch die aktuelle



These nicht als endgültig anzusehen, sondern vielmehr als ein Teil eines sehr komplexen immunologischen Geschehens als Reaktion auf die sublinguale Applikation von Allergenen anzusehen. Die Komplexität des Immunsystems, die vielen unterschiedlichen Allergene und Präparate, die genetischen, geografischen und soziomedizinischen Besonderheiten der Weltbevölkerung lassen noch viele Fragen ungeklärt.

## **6.1 Klinische Daten**

Die Auswertung der Daten bezüglich der subjektiven Symptomverbesserung erbrachte insgesamt eine erhebliche Verbesserung des Wohlbefindens. Untersucht wurden ein sehr allgemein formulierter Parameter „Befindlichkeitsscore“ als auch spezielle Scores, mit welchen die Ausprägung der Allergischen Rhinitis, des Medikamentenbedarfs, Asthmaausprägung, Forcierten Einsekundenkapazität - FEV 1 und von Nebenwirkungen quantifiziert wurden.

Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Resultaten, welche in vorhergehenden Untersuchungen dieser Forschungsgruppe beobachtet wurden. So beschrieb Schneider 2004 in ihrer Arbeit ähnliche Resultate bei gleichem Studienaufbau. Diese Verbesserung der Symptomatik in einer über Jahre angelegten Untersuchung legt den Schluss nahe, dass unsere Resultate mehr als nur tendenzielle Veränderungen oder Placeboeffekte darstellen. Die Langzeiteffekte wurden von Steiner 2005, ebenfalls aus der Forschungsgruppe um Markert, beschrieben. So zeigte sich in einer Gruppe von 73 Patienten, welche die Immuntherapie seit einem Jahr beendet hatten, eine bleibende subjektive Verbesserung der allergischen Symptome bei 74%. Weitere sechs Prozent gaben eine zunehmende Verbesserung nach Therapiebeendigung an. Auch nach drei Jahren waren bei 48 der 56 Patienten also 86 % bleibende Therapieeffekte nachweisbar. Nach Beendigung der Therapie gaben 34% einen erneuten Behandlungsbedarf von allergischen Symptomen an, wobei es sich aber ausschließlich um leichtere Symptome als vor Therapie handelte. 66 % waren also nach Beendigung der Einnahme symptomfrei und benötigten keinerlei supportive Medikation mehr. ( Steiner et al 2009 )

Neben unseren eigenen Daten existieren noch eine Reihe weiterer Untersuchungen, welche oben genannte Beobachtungen stützen und einen Therapieeffekt nahelegen. So wurde im Jahre 2005 eine Metaanalyse in Allergy veröffentlicht, welche 22 doppelblind-placebo-

kontrollierte Studien und damit 979 Patienten einschloss. (Wilson et al. 2005) Insgesamt zeigte sich auch hier eine signifikante Reduktion von Symptomscores im Erwachsenenalter. Fünf Studien, welche allerdings sehr heterogen waren, berücksichtigten nur Patienten im Kindesalter. Die Subgruppe der untersuchten Kinder, wies nicht signifikante Änderungen auf. Allerdings waren auch hier die Fallzahlen sehr niedrig. Zudem wurden unterschiedliche Allergene, Dosierungen und Präparate nicht in vollem Ausmaß berücksichtigt. Nur 4 Studien wiesen einen Therapiezeitraum von länger als einem Jahr auf, was die Aussagekraft dieser Metaanalyse erheblich einschränkt, da diese einen längeren Therapiezeitraum bzw. die Langzeitwirkung nicht berücksichtigt. In weiteren aktuelleren placebokontrollierten Untersuchungen untersuchten Dahl ( Dahl et al 2006, Pfaar et al 2008, Ott et al. 2009 ) annähernd zweitausend Patienten. In allen Studien war eine signifikante Verbesserung der Symptome zu erkennen. Damit existiert eine Reihe gut angelegter Analysen, welche die Basis für eine gut fundierte Datenlage darstellen. Aufgrund dieser neueren Studien lassen sich Zweifel an der Wirksamkeit kaum aufrechterhalten. Eine weitere aktuell publizierte ebenfalls doppelblind, und placebokontrollierte Studie von Wahn, an welcher 266 Kinder zwischen 5 und 17 Jahren mit allergischer Rhinokonjunktivitis teilnahmen, zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion der Symptomscores unter SLIT. ( Wahn et al. 2009) Diese gut aufgebauten Untersuchungen unterstreichen und bestätigen unsere Ergebnisse, da die untersuchten Probanden denen unserer Altersgruppen entsprechen. Perspektivisch wird es aufgrund der sich ständig verbessernden Datenlage nur eine Frage der Zeit sein, dass die nebenwirkungsarme SLIT auch im pädiatrischen Bereich voll etabliert werden kann.

## **6.2 Immunologische Resultate**

Diese Untersuchung hatte das Ziel, zum Verständnis des Wirkmechanismus der Sublingualen Immuntherapie beizutragen. Um die Aussagekraft der deutlichen klinischen Resultate zu erhöhen wurden verschiedenen Oberflächenmarker auf B und T Zellen untersucht. Zusätzlich wurde die Induzierbarkeit von intrazellulären Interleukinen vor und während der Therapie gemessen.

## 6.2.1 Extrazelluläre Parameter

### 6.2.1.1 CD23

CD23 wird auch als niedrigaffiner IgE Rezeptor Fc $\epsilon$ RII bezeichnet, welcher keine strukturelle Ähnlichkeiten mit dem hochaffinen Rezeptor Fc $\epsilon$ RI aufweist. Dieser Rezeptor ist auf unterschiedlichen Zelltypen wie B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten, Eosinophilen, Dendritischen Zellen und einigen Thymuszellen nachweisbar. Es existieren zwei verschiedene Subtypen CD23a, welches auf B-Zellen vorkommt, und CD23b welches mittels IL-4 auf den anderen oben genannten Zelllinien exprimiert wird.

CD23 ist zudem in einer löslichen Form nachweisbar. Erhöhte Plasmaspiegel scheinen die Differenzierung von nativen B-Zellen zu allergenspezifische B-Zellen und damit auch die Bildung von spezifischem IgE zu begünstigen. Ig-E wiederum reguliert die Expression vom niedrig-, und hochaffinen IgE-Rezeptor ( Fc $\epsilon$ R I ) hinauf.

Versuche mit sogenannten Knockout-Mäusen, welchen das CD23 Gen fehlte, zeigten, dass die polyklonale IgE Immunantwort unverändert blieb. Hingegen war die antigenspezifische Reaktion in Anwesenheit eines IgE-Antigenkomplexes gestört. Die spezifische Ig-E vermittelte Antikörperexpression war nicht nachweisbar. Dies demonstriert eine mögliche Rolle des CD23 bei der Bindung von IgE-Antigenkomplexe auf antigenpräsentierenden Zellen. (Janeway 2001)

Im Jahre 2003 brachten weitere Untersuchungen neue Erkenntnisse. (Roever et al. 2003) So wurde eine Abnahme der CD23 Expression auf unterschiedlichen Zelltypen unter Immuntherapie postuliert. Dieser Rückgang war abhängig von der Allergendosis und IFN- $\gamma$  bzw. IL-10 vermittelt.

Unsere Ergebnisse zeigen einen nicht signifikanten Rückgang der CD23 Expression, dies deckt sich mit den Messungen von Roever und der aktuellen Datenlage.

### 6.2.1.2 CD154

Das Membranprotein CD40 und sein Ligand CD154 wird zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren gezählt. CD40 lässt sich auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, Dendritische Zellen, hämatopoetischen Stammzellen und Carcinomzellen nachweisen. (van

Kooten et al. 2000) Die Aktivierung von B-Zellen mittels des CD40-CD154 Systems kann in einem Immunglobulinklassenswitch zugunsten IgE enden. Markert beobachtet schon 1999 eine erhöhte CD154 Expression auf T-Lymphozyten allergischer Individuen im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach unspezifischer Stimulation. ( Markert 1999 ) Die Interleukine 4 und 13 fungieren an dieser B-Zell Proliferation vermutlich als starke Cofaktoren, während das Interleukin 10 an einer verstärkte Expression von IgG Subtypen beteiligt ist. Ein pathologischer Mangel an CD40 kann demzufolge in einer inadäquaten Immunglobulinproduktion enden. Exemplarisch hierfür ist das Hyper-IgM Syndrom, welches durch mangelnde IgG, IgA, und IgE Sekretion gekennzeichnet ist. Ebenso interessieren sich onkologische Fachkreise für diese Interaktionen um neue Therapieansätze zur Behandlung von Leukämien zu erforschen. (Schattner 2000) Der Ligand CD154 ( CD40-Ligand) kommt hauptsächlich auf T-Helferzellen vor. Es werden aber auch weitere Liganden und damit alternative Aktivierungswege vermutet. Das System CD40 / CD154 steht an zentraler Stelle der Interaktion zwischen B und T Lymphozyten. Eine 1994 veröffentlichte Arbeit von Davidsson beschreibt einen IL-4 vermittelten Anstieg der CD40 positiven B-Zellen von Birkenallergikern während der Pollensaison im peripheren Blut. (Davidsson et al. 1994) Ippoliti et al. untersuchten 2003 in einer DBPC Studie den Einfluß einer SLIT auf die Expression von CD40. (Ippoliti et al. 2003) Allerdings war der Zeitpunkt der Probengewinnung nur 6 Monate nach Therapiebeginn, sodass das Ergebnis dieser Untersuchung nicht ganz auf unsere Messungen übertragen werden kann. Weder in der Studie von Ippoliti noch in unseren Ergebnissen konnte eine signifikante Veränderung festgestellt werden.

Dies ist möglicherweise mit der Komplexität des Immungeschehens und der Heterogenität unserer Untersuchung zu erklären. Eine Immunreaktion ist kein statischer Zustand, sondern ein komplexes System mit vielen Einflussfaktoren. Die Proben wurden zu keinem definierten Zeitpunkt entnommen. So ist eine Überlagerung von Therapieeffekten leicht möglich.

#### 6.2.1.3 CD86

CD28 ist auf T-Zellen lokalisiert und wird strukturell zur Immunglobulinsuperfamilie gerechnet. Die Bindung eines Liganden wie CD86 oder CD80, welche beide als sogenannte B7 Proteine ausschließlich auf Zellen vorkommen, die T-Zellen aktivieren können, ist ein notwendiges Signal zur Stimulation von naiven T-Zellen. Erst wenn die T-Zelle diesen Costimulus und einen Stimulus über den T-Zell-Rezeptor erhält, folgt die weitere klonale

Vervielfältigung und Differenzierung. Die Expression des schon erwähnten CD154 ist ebenfalls auf eine Interaktion von CD86/28 zurückzuführen. Die Aktivierung des CD28/CD86 Systems wird verstärkt nach CD40/CD154 Interaktion. Kostimulatorische Moleküle können also die T-Zell Antwort modulieren indem sie diese verstärken, abschwächen oder in die Feinregulierung der jeweiligen Zellantwort eingreifen. Morikawa fand 2001 im Plasma von Patienten, welche unter Zedernpollinosis litten, ebenfalls signifikant erhöhte Expression von CD28 auf PBMC im Vergleich zu gesunden Kontrollen. (Morikawa et al. 2001) Aus diesen Resultaten leitete er eine verstärkte Bereitschaft zur TH2 Antwort ab.

Im Serum von Asthmatikern wurden außerdem erhöhte Werte für die lösliche Formen sCD28 und sCD86 nachgewiesen. Dies ist als Zeichen einer Dysregulierung der T-Zellantwort zu werten. (Wong et al. 2005 ) Ebenfalls aus dieser Arbeitsgruppe erschien 2006 eine Arbeit, welche mittels Längsschnittuntersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Höhe der löslichen Glycoproteinen sCD28 bzw. sCD86 und dem Schweregrad des Asthmas aufzeigte. So wurde bei sinkendem Plasmaspiegel eine Zunahme des expiratorischen Peak-Flows gemessen. (Ip et al. 2006) Chen postulierte 2006 in „Allergy“ dieses System in die Entwicklung neuer Therapiestrategien zu involvieren. So könnten Antikörper oder Therapeutika, welche in diese Regulationsmechanismen eingreifen, von großer Bedeutung sein. (Chen et al. 2006) Es gibt wenige Untersuchungen, welche die Expression von CD28/CD86 unter Immuntherapie zum Gegenstand hatten. Unsere Ergebnisse erlauben diesbezüglich keine Rückschlüsse, was an den unterschiedlichen Allergengruppierungen oder an den nicht streng definierten Abnahmezeitpunkten liegen könnte. Allerdings konnte Plewako 2004 an Birkenpollenallergikern nachweisen, dass unter SIT weniger Zellen diese Costimuli exprimieren als unter Placebo. (Plewako et al. 2004) Derzeit wird weiter an der Bedeutung dieses Komplexes für die sogenannte orale Toleranzentwicklung unter SLIT geforscht. (Allam et al.2006)

#### 6.2.1.4 CD124

Die Bindung der Interleukine 4 und 13 an das Transmembranprotein CD124 der B-Zelle begünstigt eine verstärkte IgE Expression. Genetische Untersuchungen bestätigen einen Zusammenhang zwischen der Codierung der alpha-Kette dieses Rezeptors und einer Veranlagung zur Atopie.(Lee et al. 2004 ) Die Anlagerung von IL-4 an das Rezeptormolekül CD124 an der T-Zelle und die folgende Zytokinkaskade spielt eine zentrale Rolle in der TH1/TH2 Theorie, indem es die T-Zelldifferenzierung zugunsten des TH2-Subtypes

verschiebt. Seit einigen Jahren wird versucht, mit diesem Wissen in die Pathomechanismus der atopischen Reaktion einzugreifen. Es existieren einige Versuche mittels IL-4 Rezeptorantagonisten, diesen Kreislauf zu unterbrechen. Borish konnte 2001 (Borish et al. 2001) in einer DBPC Studie zeigen, wie die Inhalation von rekombinantem sIL-4 Rezeptor eine signifikante Verbesserung von Symptomscores und FEV1 zur Folge hatte. Im Tiermodell konnte man dies 2008 mittels intratrachealer Applikation von IL-4-R-Antagonist nachvollziehen. (Tiam et al. 2008) Unsere Messungen zeigen einen signifikanten Rückgang der CD124 Expression unter SLIT. In zwei weiteren Untersuchungen wurden vergleichbare Ergebnisse beobachtet. Eine Untersuchung im Jahre 2002 (Grzela et al. 2002) konnte ebenso eine Reduktion der CD124 Expression unter Immuntherapie zeigen wie eine von 2004. (Kowal et al. 2004) Allerdings wurden in beiden Studien die Allergene auf dem subkutanem Wege appliziert, sodass diese Ergebnisse nicht kritiklos verglichen werden können. Aus diesem Grunde sind auch hier weitere DBPC Studien nötig, um eine validere Aussage treffen zu können.

#### 6.2.1.5 CD54 (ICAM-1)

Das Protein CD54 wird auch als ICAM-1 bezeichnet, was seine Funktion als interzelluläres Adhäsionsmolekül verdeutlicht. Es lässt sich auf antigenpräsentierenden Zellen und Endothelzellen nachweisen und wird der Immunglobulinsuperfamilie zugeordnet. Als Ligand fungieren vor allem LFA-1 und bestimmte Rhinoviren. (Staunton et al. 1989) Eine Zellaktivierung mittels der Bindung des Liganden ermöglicht der Zelle die Blutbahn zu verlassen, indem es das Endothel passieren kann. Außerdem verstärkt CD54 die Bindung der APC an der T-Zelle. Eine initial niedrigaffine Bindung von LFA-1 der T-Zelle, und CD54 der APC kann nach Kontakt zwischen dem T-Zell-Rezeptor der T-Zelle und MHC-Komplex der APC aufgrund einer Konformationsänderung des LFA-1 zu einer hochaffinen Bindung konvertieren. Diese Bindung kann mehrere Tage bestehen bleiben und ermöglicht die Proliferation und Differenzierung der T-Zelle. Die Rolle des CD54 Moleküls im Formenkreis der atopischen Erkrankungen ist relativ gut untersucht. So zeigten einige Untersuchungen unter SLIT eine Reduktion des löslichen CD54 im Plasma. (Reich 2003 und Passalacqua et al. 1999) Da dieser Parameter mit dem Beschwerdebild korreliert, könnte CD54 als Verlaufparameter geeignet sein. (Passalacqua et al. 1998, Schneider 2005, Reich 2003) Unter symptomorientierter Therapie mittels des H1-Rezeptorantagonisten Terfenadine konnte eine messbare Reduktion des sICAM-1-Moleküls (Ciprandi et al. 1999) im Plasma

nachgewiesen werden. Applikation von Loratadine, auch ein Antihistaminika, hatte ebenfalls eine Verbesserung der Symptome und eine Reduktion des sICAM-1 zur Folge. (Ciprandi et al. 1997 ) Dieser Therapieeffekt ist auf eine Reduktion der verringerten Histaminausschüttung und damit reduzierter CD54 Expression zurückzuführen.

Die Auswertung unserer Daten ergab eine diskrete, nicht signifikante Erhöhung des T-zellgebundenen CD54. Die Ursache könnte sowohl in der Heterogenität der Allergene als auch in der genetischen Variabilität der Probanden liegen. Es ist jedoch auch zu vermuten, dass die Expression von CD54 im weiteren Verlauf der Immuntherapie wieder abnimmt. Die vorliegenden Arbeiten rechtfertigen weitergehende Untersuchungen der CD54 Expression, da dieses System sowohl als Verlaufsparmeter als auch als Ziel therapeutischer Interventionen von Interesse ist.

#### 6.2.1.6 CD69

Das Glycoprotein CD69 wird an der Oberfläche aktivierter T-Zellen, Langerhanschen Zellen und B-Zellen exprimiert. Auf der T-Zelle stellt es einen Marker der frühen Aktivierungsphase dar. Über die Funktion und spezielle Liganden ist bisher noch wenig bekannt. (Marzio et al. 1999) 2006 konnte ein Zusammenhang zwischen der Dieselpartikelexposition und dem Aktivierungszustand der T-Zellen hergestellt werden. (Mamessier et al. 2006) Nach Exposition mit Dieselpartikel war auf T-Zellen von Asthmatikern proportional mehr CD69 nachweisbar als auf denen der gesunden Kontrollen. Die Aktivierung fand in diesem Falle rein mit dem Schadstoffpartikel, also ohne eigentliches Allergen, statt. Dies deutet auf den wichtigen Faktor Umweltverschmutzung in der Pathogenese des allergischen Asthmas hin. Rojas-Ramos veröffentlichte 2007 eine Arbeit, in der sie die Expression von CD69 auf T-Zellen von Kindern mit allergischem Asthma mit denen gesunder Kontrollen verglichen. Die CD69 Expression auf den T-Zellen der Allergikergruppe war demnach signifikant erhöht. (Rojas-Ramos et al. 2007) Die CD69 Expression unter Immuntherapie war ebenfalls schon Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Huang konnte 2002 ebenso wie Schneider 2004 zeigen, dass unter erfolgreicher Immuntherapie die Expression von CD69 niedriger als in den Patientengruppen vor der Therapie und in der Kontrollgruppe war. (Huang et al. 2002 und Schneider 2004)

Unsere Ergebnisse zeigen ebenfalls eine signifikant verminderte Ausprägung des CD69 Moleküls unter SLIT.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass CD69 einen relativ unspezifischen frühen Aktivierungsmarker darstellt. Über die möglichen Liganden ist wenig bekannt, weitere Untersuchungen dieses Aspektes sind gerechtfertigt. Es ist vorstellbar, dass dieser Parameter als Verlaufsparemeter einer Immuntherapie geeignet sein könnte.

## **6.2.2 Expression intrazellulärer Parameter nach unspezifischer Stimulation**

### **6.2.2.1 IFN $\gamma$**

Interferon  $\gamma$ , ein Glycoprotein, wird als wichtiges Zytokin der TH1-Antwort angesehen. Die Aktivierung von TH1 Zellen ist wiederum Voraussetzung für die Aktivierung von Makrophagen. Das Interferon- $\gamma$  hemmt einerseits die Proliferation von TH2 Zellen, welche wiederum als effektive B-Zell Aktivatoren anzusehen sind, begünstigt andererseits die TH1-Antwort, welche wiederum in der Makrophagenaktivierung mündet. Interferon- $\gamma$  steht somit neben anderen regulatorischen Interleukinen wie IL-2, IL-4, IL-10 im Mittelpunkt der Differenzierung von TH0 zu TH1 bzw. TH2 und damit an einer wichtigen Schaltstelle des Immunsystems. (Gajewski et al. 1988) Die Interleukine des jeweiligen Pfades hemmen die Differenzierung der jeweils anderen TH-Subpopulation und fördern gleichzeitig die weitere Entwicklung der eigenen Lymphozytenreihe. Die Datenlage zur IFN- $\gamma$  Expression unter SLIT ist widersprüchlich. Eine aktuelle Veröffentlichung von Ciprandi 2008 zeigt einen signifikanten IFN- $\gamma$  Anstieg unter SLIT, welcher mit einer Verbesserung von Symptomscores positiv korrelierte. (Ciprandi et al. 2008) Eine Vergleichsstudie, welche Unterschiede im Wirkmechanismus von SCIT und SLIT zum Gegenstand hatte, konnte zwar bei beiden Therapieformen eine Symptomverbesserung zeigen, aber unterschiedliche Reaktionsmuster im peripheren Blut. Während in beiden Gruppen unter Therapie niedrigere IL2-Spiegel gemessen wurden, konnte ein Anstieg des spezifischen IgE und IgG4 nur im Plasma der subkutan behandelten Patienten nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus hin. (Antunez et al. 2008) In unserer Versuchsreihe war die Expression von intrazellulären IFN- $\gamma$  nach unspezifischer Stimulation mit Ionomycin in der Gruppe unter SLIT gegenüber vor Therapiebeginn signifikant erhöht. Allerdings war in der Kontrollgruppe ein relativer Rückgang von IFN- $\gamma$  nachweisbar, was konträr zu einer ähnlichen Versuchsreihe von Wong 2001 steht.



#### 6.2.2.2 IL-2

IL-2 wird wie Interferon- $\gamma$  von TH1 Zellen exprimiert und ist als wichtiges autokrines Signal zur weiteren klonalen TH1 Vermehrung zu verstehen. Dieser Schritt benötigt die Aktivierung von CD28 als Costimulus. Wir konnten unter Therapie einen signifikanten Anstieg der unspezifischen Stimulierbarkeit von IL-2 beobachten. Andere Untersuchungen wie die im Jahre 2008 veröffentlichte Arbeit von Antunez kommen zu konträren Ergebnissen. Antunez verglich das klinische Outcome und Zytokine von pädiatrischen Patienten unter SCIT bzw. SLIT miteinander. Es zeigte sich, dass beide Gruppen in ähnlichem Maße von der Therapie profitierten. In beiden Therapiegruppen war eine Reduktion der IL-2 Expression messbar. Andere Parameter wie IgE und IgG4 unterschieden sich jedoch. Er folgerte daraus, dass beide Therapien eine Anwendung rechtfertigen, aber ein unterschiedlicher Wirkmechanismus zugrunde liegen müsse. (Antunez et al. 2008) De Amici et al. beobachteten 2001 einen Anstieg der IL-2-Expression im Serum und interpretierten dies als Zeichen einer verringerten entzündlichen Antwort im Sinne einer Verschiebung von lymphozytärer TH2 zu TH1 Antwort unter Immuntherapie. (de Amici et al. 2001) Die weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Bär 2001) zeigten eine bei Atopikern im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Expression von IL-2, welche unter Therapie rückläufig war. Allerdings war in einer Verlaufsstudie von van Bever ein initialer Anstieg und anschließender Abfall des IL-2 Levels unter den Ausgangswert zu beobachten. (van Bever et al. 1998) Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass SLIT sich auf die Expression von IL-2 auswirkt. Dies scheint in mehrere Phasen gegliedert zu sein.

Da unsere Messungen keine definierten Abnahmezeitpunkte des Patientenblutes enthielten, dies aber aufgrund des phasenhaften Verlaufes der IL-2 Expression sehr wichtig sein kann, ist es schwierig, genauere Rückschlüsse aus unseren Daten zu ziehen. Es ist durchaus möglich, dass die erhöhten IL-2 Werte unter SLIT eine Verschiebung der Immunantwort von TH2 zu TH1 anzeigen.

#### 6.2.2.3 CD154

Die Induzierbarkeit von intrazellulärem CD154 war während der Therapie signifikant reduziert und spiegelt die ebenfalls reduzierte extrazelluläre Expression dieses Merkmales unter SLIT wieder. Die Interaktion von CD40 und CD154 ist besonders während der frühen Immunantwort von Bedeutung. So geht man davon aus, dass APC, nach Aufnahme und

Prozessierung eines Antigens zu lokalen Lymphknoten migrieren. Dort präsentieren diese das entsprechende Antigen nativen T-Zellen. Dies resultiert in einer verstärkten Expression von CD154 auf der T-Zelle. Nachfolgend kommt es zur Bindung von CD154 der T-Zelle mit CD40 der APC was in weiteren Reaktionsschritten ein IgE-Immunglobulinklassenswitch zur Folge haben kann. (Grewal und Flavell 1996) Die signifikant geringere Induzierbarkeit von CD154 während der Behandlung mit SLIT deutet demnach auf eine geringere allergische Reaktionsbereitschaft und damit einen Therapieeffekt hin. Ähnliche Effekte beobachteten Zhu et al unter Immuntherapie, allerdings wurde in dieser Arbeit die extrazelluläre Expression von CD154 untersucht.(Zhu et al. 2008)

## 7. Schlussfolgerung

Diese Untersuchung sollte erste richtungsweisende Tendenzen der Immunantwort und klinische Effektivität unter SLIT aufzeigen.

Sowohl die extrazelluläre Expression des lymphozytären Aktivierungsmarker CD69 als auch die des IL-4 Rezeptor CD124 konnte auf B-Lymphozyten mittels SLIT signifikant reduziert werden. Andere Parameter wie der IgE-Rezeptor CD23 und CD154, welcher für den Immunglobulinklassenswitch essentiell ist, waren unter Therapie ebenfalls geringer nachweisbar, dies jedoch ohne Signifikanz.

Die intrazellulären Messungen der Induzierbarkeit von Zytokinen untermauern die These einer Veränderung des TH1/TH2 Gleichgewichtes aufgrund eines veränderten

Zytokinmilieus. So war die unspezifische Induzierbarkeit von IL-2 und IFN- $\gamma$  unter Therapie signifikant erhöht, die unspezifische Induzierbarkeit von CD154 signifikant erniedrigt, was eine Verschiebung zugunsten der TH1 Antwort nahe legt.

Die labortechnischen Messungen werden gestützt vom signifikanten Rückgang der Beschwerdebilder von behandelten Patienten, die sich in signifikanten Änderungen der Scores für das subjektive Befinden, der Asthmaausprägung, des Rhinitisscores, Abnahme des Medikamentenbedarfs und Zunahme der FEV1 zeigen. Nebenwirkungen wurden als milde und passager beschrieben.

Die größer werdende Anzahl gut geplanter kontrollierter Studien, welche in den letzten Jahren zum Thema SLIT publiziert wurden und die Effizienz dieser Therapieform bestätigen, lässt die Zahl der Kritiker dieser Therapieform geringer werden. Die Wirksamkeit wird kaum mehr angezweifelt, der Wirkmechanismus ist, trotz intensiver Forschungen, noch nicht vollständig aufgeklärt. Es lassen sich sowohl Veränderung im peripheren Blut, als auch in der oralen Mukosa verifizieren. Der Wirkmechanismus scheint sich von dem der subkutanen Anwendungsform zu unterscheiden, was aufgrund des unterschiedlichen Applikationsortes auch nicht verwundert. Veränderungen der Mukosa legen eine lokale Reaktion des mukosaassoziierten Immunsystemes MALT nahe, welche natürlich nicht isoliert betrachtet werden dürfen. Eine Immunreaktion sollte nicht als lokale Reaktion einer Schleimhaut

angesehen werden, da die Mukosa nur ein Teil des individuellen Immunsystemes darstellt und zahlreiche Schnittstellen zu den anderen Immunorganen vorhanden sind.

Seit Jahren propagierte Forderung nach Standardisierung der Extrakte wird aktuell im CREATE – Projekt verwirklicht. (Ree et al. 2008) Damit ist eine wesentliche Voraussetzung der besseren Therapiestandardisierung und damit eine bessere Vergleichbarkeit von Studien erfüllt. Zudem werden zunehmend validierte Empfehlung zur optimalen Dosierung der Präparate veröffentlicht. (Didier et al. 2009)

Allerdings sind weitere, möglichst verblindete und placebokontrollierte Untersuchungen nötig, um den Effekt dieser Therapie für die jeweiligen Allergene im Einzelnen zu untersuchen.

## Patientendaten

Laufende Nr.	Patientenname	Geburtsdatum	Abnahmedatum
--------------	---------------	--------------	--------------

## Immunglobulin E

IgEges	Spezifisches IgE					
		RK		RK		RK

## Diagnose

Erstdiagnose der Allergie im Jahr \_\_\_\_\_

Frühblüher ☐1

Gräser/ Roggen ☐2

Milbe ☐3

Kontrolle ☐10

## Behandlung

Beginn am \_\_\_\_\_

(Trennung nach Jahren; immer bis zum vollendeten Jahr)

Pangramin SLIT ☐ Sublivac SLIT ☐ subkutane Therapie ☐ klassische Pharmakotherapie ☐

## Rhinokonjunktivitis

keine ☐0

leicht ☐1

mittel ☐2

schwer ☐3

## Asthma

Ausprägung (D. Gesells. f. Pneumologie)

intermittierend

leicht

☐1

persistierend

mittelgradig

☐2

kein ☐

Schwer

☐3

☐4

FEV 1

Bronchiale Hyperreagibilität

nein ☐0

leicht ☐1

Schwer ☐2

## Ekzem

Ausprägung

kein ☐0 (0 Gelenke)

leicht ☐1 (1 -2 Gelenke)

mittel ☐2 (3-4 Gelenke)

stark ☐3 (5-6 Gelenke)

Häufigkeit

nie ☐0

1-5x jährlich ☐1

6-10x jährlich ☐2

öfter als 10x jährlich ☐3

## Befindlichkeitsscore

## Begleitende Medikamentöse Grundtherapie

gelegentlich saisonal ☐1 permanent saisonal ☐2

nie ☐0

gelegentlich ☐2 \_\_\_\_\_ permanent ☐3

## Nebenwirkungen der Hyposensibilisierung

keine ☐0

lokal ☐1 Symptome der Grundkrankheit ☐2

Schock ☐3

## Ausscheiden aus der Studie (Mehrfachauswahl möglich)

Beschwerdefreiheit ☐

keine Compliance ☐

Übergang zu s.c. Applikation ☐

Arztwechsel ☐

Nebenwirkungen ☐

Unzufriedenheit ☐

andere Erkrankungen ☐

## Abbildungsverzeichnis

- Abb 1 Bestand der Beifuß-Ambrosie an einer Bundesstraße bei Mannheim  
( Quelle : Julius Kühn Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanze)
- Abb.2 Beifuß-Ambrosie zu Beginn der Blüte mit deutlich rötlichen, behaarten  
Stängeln (Quelle: Julius Kühn-Institut - Bundesforschungsinstitut für  
Kulturpflanzen (JKI)
- Abb.3 Einfluß von Zytokinen auf die Differenzierung einer TH0 Zelle zu TH1 bzw.  
TH2
- Abb. 4 Der Allergische Marsch, Verlauf der unterschiedlichen Atopieausprägungen.
- Abb. 5 Orale Toleranzmechanismen ( Quelle : Stallergens )
- Abb. 6 Abgrenzung von Zellfraktionen mittels Durchflußzytometrie.
- Abb 7a, 7b Dot-Plot“ 2-Farben Analyse
- Abb. 8 Vergleich der subjektiven Befindlichkeit vor und unter der Therapie
- Abb. 9 Ausprägung des Rhintisscores vor Beginn der Therapie und während der  
Behandlung mit SLIT
- Abb. 10 Medikamentenbedarf vor und während Sublingualer Immuntherapie
- Abb. 11 Astmaausprägung vor und während SLIT
- Abb. 12 Entwicklung der Forcierten Einsekundenkapazität FEV1 unter SLIT
- Abb. 13 Nebenwirkungen der SLIT
- Abb. 14 Prozentuale B-lymphozytäre CD23 Expression
- Abb. 15 Ausprägung der B-Zell CD86 Expression
- Abb. 16 CD124 auf B-Zellen während und vor SLIT
- Abb. 17 Vergleich der prozentuale Expression von CD154 auf T-Zellen
- Abb. 18 CD54 Expression auf T-Zellen in Prozent vor und während SLIT
- Abb. 19 T-Zell Expression von CD69 unter SLIT in Prozent
- Abb. 20 Intrazelluläre Interferon- $\gamma$  Sekretion nach unspezifischer Stimulation
- Abb. 21 Expression der intrazellulären CD40-Ligand Sekretion nach unspezifischer  
Stimulierung: vor Therapie, während SLIT und einer gesunden Kontrollgruppe
- Abb. 22 Induzierbarkeit der lymphozytären intrazellulären IL-2 Expression  
vor, während SLIT und einer gesunden Kontrollgruppe
- Abb. 23 Induzierbarkeit der lymphozytären intrazellulären IL-4 Expression  
vor, während SLIT und einer gesunden Kontrollgruppe

## **Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	Dosierungsschema 1, Initialbehandlung Sublivac®
Tab. 2	Dosierungsschema 2, Initialbehandlung Sublivac ®
Tab. 3	Dosierungsschema 3, Fortsetzungsbehandlung Sublivac ®
Tab. 4	Schema der intrazellulären Messung
Tab. 5	Schema zur Laborbestimmung der extrazellulären CD
Tab. 6	Befindlichkeitsscore vor und unter Therapie
Tab. 7	Rhinitisscore vor und während der Therapie
Tab. 8	Medikamentenbedarf vor und unter Therapie
Tab. 9	Asthmascore vor und während SLIT
Tab.10	FEV1 vor und während SLIT Therapie
Tab. 11	Verteilung der Nebenwirkungen vor und unter Therapie
Tab. 12	CD23Expression im Therapieverlauf
Tab. 13	CD86 Expression vor und unter Therapie
Tab. 14	CD124 Expression auf B-Zellen
Tab. 15	Statistik der CD154 Expression auf der T-Zelle
Tab. 16	Mittelwerte der CD54 Expression
Tab. 17	Statistik von CD69 auf T-Zellen während SLIT
Tab. 18	Veränderung der Interferon- $\gamma$ Sekretion nach unspezifischer Stimulation
Tab. 19	Mittelwerte und Standardabweichung der CD40-Ligand Expression
Tab. 20	IL-2 Veränderung nach unspezifischer Stimulation vor und während Therapie und bei gesunden Probanden
Tab. 21	Statistik der intrazellulären IL-2 Expression

## Literatur und Quellenverzeichnis

Abbas A, Lichtmann A: Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>th</sup> edition. Saunders

Abramson MJ, Harrap SB: The new asthma genetics and its implication for public health. Public Health Rev. 1998;26(2):127-44

Akdis M, Blaser K, Akdis CA: T regulatory cells in allergy. Chem Immunol Allergy. 2006;91:159-73.

Allam JP, Stojanovski G, Friedrichs N, Peng W, Bieber T, Wenzel J, Novak N: Distribution of Langerhans cells and mast cells within the human oral mucosa: new application sites of allergens in sublingual immunotherapy? Allergy. 2008 Jun;63(6):720-7.

Allam JP, Niederhagen B, Bücheler M, Appel T, Betten H, Bieber T, Bergé S, Novak N: Comparative analysis of nasal and oral mucosa dendritic cells. Allergy. 2006 Feb;61(2):166-72.

Alberternst B. et al. : Biologie, Verbreitung und Einschleppungswege von Ambrosia artemisiifolia in Deutschland und Bewertung aus Naturschutzsicht. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzbund; 58 (11) 2006

André C, Vatrinet C, Galvain S, Carat F, Sicard H. Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children and adults. Int Arch Allergy Immunol. 2000 Mar;121(3):229-34.

Antúnez C, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Torres MJ: Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. Pediatr Allergy Immunol. 2008 May;19(3):210-8



Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft : Stellungnahme der AkdÄ zur allergen-spezifischen Immuntherapie. Deutsches Ärzteblatt 2007; 104 (48):3355-57

AWMF-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft Allergologie und Gesellschaft für pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin :Die spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankungen Allergo J 2006;15: 56-74

Bachert C, van Cauwenberge P. The WHO ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma) initiative. Chem Immunol Allergy. 2003;82:119-26

Bachert C, Lange B, Lange G : Das Management der allergischen Rhinitis und Ihr Einfluß auf das Asthma. Allergologie; 2002; 1:7-18

Bachert C : Sublinguale Immuntherapie – Eine Bestandsaufnahme mit kontrollierten Studien zu Wirksamkeit, Verträglichkeit, Langzeiteffekten und Prävention bei Kindern und Erwachsenen mit Präparaten von Alk-Scherax. Allergologie 2007; 30(1):1-13

Bär C 2002.Vergleich der intrazellulären Interleukin -Produktion in T-Zell-Kulturen aus dem Blut gesunder und allergischer Kinder vor und unter spezifischer Immuntherapie. Dissertation. Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Bellinghausen I, König B, Böttcher I, Knop J, Saloga J: Inhibition of human allergic T-helper type 2 immune responses by induced regulatory T cells requires the combination of IL-10-treated dendritic cells and transforming growth factor-beta for their induction. Clin Exp Allergy. 2006 Dec;36(12):1546-55.

Berg A, Filipiak-Pittroff B, Krämer U, Link E, Bollrath C, Brockow I, Koletzko S, Grübl A,

Bergmann, K.-Ch., Wolf, H., Schnitker, J. & Petermann, F. (2000). Lebensqualität und Compliance von Patienten bei der spezifischen Immuntherapie mit Gräser- und Roggenallergenen (LQC-Studie). Allergo Journal, 9, 480-488.

Betsi GI, Papadavid E, Falagas ME.: Probiotics for the treatment or prevention of atopic dermatitis: a review of the evidence from randomized controlled trials.Am J Clin Dermatol. 2008;9(2):93-103

Bødtger U, Poulsen LK, Jacobi HH, Malling HJ: The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy - a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy*. 2002 Apr;57(4):297-305.

Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C: Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 Sep;120(3):707-13. Epub 2007 Aug 6.

Bousquet J, Vignola AM, Campbell AM, Michel FB: Pathophysiology of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996 Jul;110(3):207-18

Bousquet J, Lockey R, Malling : WHO Position Paper – Allergen immunotherapy : therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53:1-42

Boutin-Forzano S, Hammou Y : Air pollution and atopy. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2005;37(1):11-6

Boquete M, Carballada F, Exposito F, Gonzalez: Preventive immunotherapy. *Allergol Immunopathol* 2000; 3:89-93

Borish LC, Nelson HS, Corren J, Bensch G, Busse WW, Whitmore JB, Agosti JM; IL-4R Asthma Study Group: Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Jun;107(6):963-70.

Bufe A, Ziegler-Kirbach E, Stoeckmann E, Heidemann P, Gehlhar K, Holland-Letz T, Braun W: Efficacy of sublingual swallow immunotherapy in children with severe grass pollen allergic symptoms: a double-blind placebo-controlled study. *Allergy*. 2004 May;59(5):498-504.

Burastero SE, Mistrello G, Falagiani P, Paolucci C, Breda D, Roncarolo D, Zanotta S, Monasterolo G, Rossi RE: Effect of sublingual immunotherapy with grass monomeric allergoid on allergen-specific T-cell proliferation and interleukin 10 production. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Apr;100(4):343-50.

Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S : Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. Cochrane Database Rev. 2007;24(1):CD001936

Carlsen KH, Iodrup Carlsen KC: Parental Smoking and childhood asthma:clinical implications. Treat. Resp. Med. 2005; 4 (5):337-46

Cauwenberge P, Bachert C, Passalacqua G, Canonica G, Durham S, Malling H, Scadding: Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. Allergy 2000; 55:116-134

Chang TW, Shiung YY: Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent. J Allergy Clin Immunol. 2006 Jun;117(6):1203-12; quiz 1213. Epub 2006 May 11

Chen CM, Morgenstern V, Bischof W et al: Dog ownership and contact during childhood and later allergy development. Eur Respir J. 2008 May; 31(5):963-73

Chen YQ, Shi HZ: CD28/CTLA-4--CD80/CD86 and ICOS--B7RP-1 costimulatory pathway in bronchial asthma. Allergy. 2006 Jan;61(1):15-26.

Cheng Z, Wang X, Wang G, Shu C, Cheng Y: [An experimental study on the regulation of expression of Thq/TH2 cytokines by allergen vaccine atomization inhalation in patients with asthma. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi. 2006 Sep;20(17):790-2.

Ciprandi G, Fenoglio D, Di Gioacchino M, Ferrera A, Ferrera F, Sormani MP, Marseglia GL: Sublingual immunotherapy provides an early increase of interferon-gamma production. J Biol Regul Homeost Agents. 2008 Jul-Sep;22(3):169-73.

Ciprandi G, Pronzato C, Ricca V, Passalacqua G, Danzig M, Canonica GW: Loratadine treatment of rhinitis due to pollen allergy reduces epithelial ICAM-1 expression. Clin Exp Allergy. 1997 Oct;27(10):1175-83.

Ciprandi G, Ricca V, Tosca M, Landi M, Passalacqua G, Canonica GW: Continuous antihistamine treatment controls allergic inflammation and reduces respiratory morbidity in children with mite allergy. *Allergy*. 1999 Apr;54(4):358-65.

Coca A and Cooke R (1923): On the classification of the phenomena of hypersensitivity, *J Immunol* 8, S. 163-82

Compalati E, Penagos M, Tarantini F, Passalacqua G, Canonica GW: Specific immunotherapy for respiratory allergy: state of the art according to current meta-analyses. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009 Jan;102(1):22-8

Dahl R, Stender A, Rak S: Specific immunotherapy with SQ standardized grass allergen tablets in asthmatics with rhinoconjunctivitis. *Allergy*. 2006 Feb;61(2):185-90.

Dahl R, Kapp A, Colombo G, de Monchy JG, Rak S, Emminger W, Rivas MF, Ribel M, Durham SR: Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Aug;118(2):434-40.

D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, et al. : Allergenic Pollen and Pollen Allergy in Europe. *Allergy* 2007 ;62 (9):976-90

Davidsson A, Karlsson MG, Hellquist HB: Allergen-induced changes of B-cell phenotypes in patients with allergic rhinitis. *Rhinology*. 1994 Dec;32(4):184-90.

De Amici M, Puggioni F, Casali L, Alesina R: Variations in serum levels of interleukin (IL)-1beta, IL-2, IL-6, and tumor necrosis factor-alpha during specific immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001 Mar;86(3):311-3.

Del Prete GF, De Carli M, D'Elis MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabbri L, Romagnani S: Allergen exposure induces the activation of allergen-specific TH2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol*. 1993 Jul;23(7):1445-9

Des Roches A, Paradis L, Meardo JL et al : Immunotherapy with a standardized Dermatophagoides pteronyssinus extract. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. J Allergy Clin Immunol 1997;99(4):450-3

Didier A, Malling HJ, Worm M, Horak F, Jäger S, Montagut A, André C, de Beaumont O, Melac M: Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. J Allergy Clin Immunol. 2007 Dec;120(6):1338-45. Epub 2007 Nov 1.

Didier A, Melac M, Montagut A, Lhéritier-Barrand M, Tabar A, Worm M.; Allergy. 2009: Agreement of efficacy assessments for five-grass pollen sublingual tablet immunotherapy. Allergy. 2009 Jan;64(1):166-71. Epub 2008 Dec 5.

Di Gioacchino M, Perrone A, Petrarca C, Di Claudio F, Mistrello G, Falagiani P, Dadorante V, Verna N, Braga M, Ballone E, Cavallucci E: Early cytokine modulation after the rapid induction phase of sublingual immunotherapy with mite monomeric allergoids. Int J Immunopathol Pharmacol. 2008 Oct-Dec;21(4):969-76.

EAN Pollenflugnetzwerk <http://www.univie.ac.at/ean/> ( am 7.6.2008)

Frew AJ: Sublingual immunotherapy. N Engl J Med. 2008 May 22;358(21):2259-64.

Gajewski TF, Fitch FW: Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of TH2 but not TH1 murine helper T lymphocyte clones. J Immunol. 1988 Jun 15;140(12):4245-52.

Gaudermann WJ, Avol E, Gilliland F, et al: The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. N Engl J Med. 2004 9;351(11):1057-67

Grevers G, Röcken M: Taschenatlas der Allergologie. Grundlagen, Diagnostik, Klinik. Thieme Verlag, Stuttgart 2001

Grewal IS, Flavell RA: The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation.

Immunol Rev. 1996 Oct;153:85-106.

Grzela K, Grzela T, Lazarczyk M, Korczak-Kowalska G, Wierzbicki P, Zawadzka-Krajewska A, Jozwiak J, Skopiński P: Influence of allergen-specific immunotherapy on IL-4-dependent Interleukin-12 production by monocytes. *Int J Mol Med*. 2002 Oct;10(4):481-4.

Halken S: Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol*. 2004 Jun;15 Suppl 16:4-5, 9-32

Heinrich J, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; GINIplus study group: Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: long-term results from the German Infant Nutritional Intervention Study (GINI). *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun;121(6):1442-7

Heinrich J, Richter K, Frye c, et al : Die Europäische Studie zu Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen. *Pneumologie* 2002; 56:297-303

Herborn N: Asthma und Allergien - Wenn die Luft zum Atmen fehlt. 2002 *Mensch&Umwelt Spezial des GSF Forschungszentrum*

Herrmann-Kunz E: Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Ost- und Westdeutschland. *Gesundheitswesen* 1999 (61)Sonderheft 2 S100-S105

Huang JL, Ou LS, Tsao CH, Chen LC, Kuo ML: Reduced expression of CD69 and adhesion molecules of T lymphocytes in asthmatic children receiving immunotherapy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002 Dec;13(6):426-33.

Inal A, Altintas DU, Yilmaz M, Karakoc GB, Kendirli SG, Sertdemir Y: Prevention of new sensitizations by specific immunotherapy in children with rhinitis and/or asthma monosensitized to house dust mite. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(2):85-91.

Incorvaia C, Frati F, Puccinelli P, Marcucci F, Di Cara G, Sensi L, Scurati S, Yacoub MR, Moingeon P: Effects of sublingual immunotherapy on allergic inflammation. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008 Sep;7(3):167-72

Ip WK, Wong CK, Leung TF, Lam CW: Plasma concentrations of soluble CTLA-4, CD28, CD80 and CD86 costimulatory molecules reflect disease severity of acute asthma in children. *Pediatr Pulmonol*. 2006 Jul;41(7):674-82.

Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A, Lenti L, Canitano N, Lucarelli S, Frediani T: Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2003 Jun;14(3):216-21.

ISSAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998; Apr 25; 351(9111):1225-32.

Jäger S.: Start, duration and intensity of the pollen season. Vortrag bei der Konferenz "The times are changing": Climate change, phenological responses and their consequences for biodiversity, agriculture, forestry and human health" 5.-7. Dezember 2001, Wageningen

Janeway CA, Travers P, Walport M. 2001. *Immunobiology*. 5<sup>th</sup> Edition. New York. Churchill-Livingstone.

Jenkins SJ, Perona-Wright G, MacDonald AS: Full development of Th2 immunity requires both innate and adaptive sources of CD154. *J Immunol*. 2008 Jun 15;180(12):8083-92

Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA: Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy*. 2006 Jul;61(7):796-807.

Jutel M, Akdis CA: T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy*. 2008;94:158-77.

Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E: Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001 Apr 7;357(9262):1076-9.

Khinchi MS, Poulsen LK, Carat F, André C, Hansen AB, Malling HJ. Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen-specific immunotherapy: a randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study. *Allergy*. 2004 Jan;59(1):45-53.

Kin NW, Sanders VM: CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism. *J Immunol*. 2007 Aug 1;179(3):1516-23

Kleine-Tebbe J, Fuchs T, Klimek L, Kühn J, Lepp B, Niggemann B: Die spezifische Immuntherapie ( Hyposensibilisierung ) mit Allergenen – Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie. *Allergo J* 2000; 9:317-324

van Kooten C, Banchereau J: CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000 Jan;67(1):2-17.

Kunz,E: Allergische Krankheiten in Deutschland. Bundesgesundheitsblätter-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2000. 43:400-406.

Kowal K, Osada J, Zukowski S, Dabrowska M, Dubuske L, Bodzenta-Lukaszyk A: Expression of interleukin 4 receptors in bronchial asthma patients who underwent specific immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004 Jul;93(1):68-75.

Krämer U, Link E, Oppermann H, Ranft U et al: Studying school beginners in western and eastern Germany: allergy trends and sensitisations 1991-2000. *Gesundheitswesen*. 2002 Dec;64(12):657-63

Krämer U, Heinrich J, Wist M, Wichmann HE: Age of entry to day nursery and allergy in later childhood: *Lancet* 1999; 6;353(9151):450-4



Larenas-Linnemann D: Subcutaneous and sublingual immunotherapy in children: complete update on controversies, dosing, and efficacy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008 Nov;8(6):465-74

Lau S, Nickel R, Niggemann B, Grüber C, Sommerfeld C, Illi S, Kulig M, Forster J, Wahn U: The development of childhood asthma: lessons from the German Multicenter Allergy Study (MAS). *Paediatric Respiratory Reviews* 2002; 3(3):265-272

Lau S, Platts-Mills TA, Riposo D et al: Longitudinal study on the relationship between cat allergen and endotoxin exposure, sensitization, cat-specific IgG and development of asthma in childhood--report of the German Multicentre Allergy Study (MAS 90). *Allergy.* 2005 Jun;60(6):766-73.

Lee SG, Kim BS, Kim JH, Lee SY, Choi SO, Shim JY, Hong TJ, Hong SJ: Gene-gene interaction between IL-4 and IL-4 receptor alpha in Korean children with asthma. *Clin Exp Allergy.* 2004 Aug;34(8):1202-8.

Lima M, Wilson D, Pitkin L, Roberts A, Nouri K, Jacobson M, Walker S, Durham S: Grass pollen sublingual immunotherapy for seasonal rhinoconjunctivitis: a randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:507-514

Mamessier E, Nieves A, Vervloet D, Magnan A: Diesel exhaust particles enhance T-cell activation in severe asthmatics. *Allergy.* 2006 May;61(5):581-8.

Markert UR, Bär C, Niess JH, Vogelsang H, Zwacka G.: Elevated CD154 (CD40 ligand) synthesis in T-cells from allergic patients after nonspecific stimulation in vitro. J Investig Allergol Clin Immunol. 1999 Jul-Aug;9(4):248-52.

Marzio R, Mauël J, Betz-Corradin S: CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999 Aug;21(3):565-82.

Märtens, P., Lobermeyer, K.: Krankheitskosten-Studie und Kosten-Nutzen-Analyse der spezifischen Immuntherapie bei Asthma. Neueste Ergebnisse einer I+G-Suisse-Studie für Gesamtdeutschland. Allergo Journal 10:341-347, 2001

McCreanor J, Cullinan P, et al: Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons of asthma. N Engl J Med; 2007 &357(23):2395-7

Morgenstern V, Zutavern A, Cyrys J et al : Atopic diseases, allergic sensitizations, and exposure to traffic-related air pollution in children. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Jun 15;177(12):1331-7

Morikawa H, Baba K: Costimulatory molecule expression on allergen-stimulated PBMC in cedar pollinosis subjects. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2001 Mar;104(3):198-207.

Mutius E. :Allergies, infections and the hygiene hypothesis-the epidemiological evidence. Immunobiology 2007;212(6):433-9

Naclerio RM: Allergic Rhinitis. N Engl J Med. 1991 Sep 19;325(12):860-9.

Nicolai T, Bellach B, Mutius EV, Thefeld W, Hoffmeister H: Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany. Clin Exp Allergy 1997 Aug;27(8):886-92

Osborn DA, Sinn J: Formulas containing hydrolysed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Oct 18;(4):CD003664

Osborn DA, Sinn JK: Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. Cochrane Database Syst Rev. 2007 Oct 17;(4):CD006475.

Okano M, Otsuki N, Azuma M, Fujiwara T, Kariya S, Sugata Y, Higaki T, Kino K, Tanimoto Y, Okubo K, Nishizaki K: Allergen-specific immunotherapy alters the expression of B and T lymphocyte attenuator, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis. Clin Exp Allergy. 2008 Dec;38(12):1891-900. Epub 2008 Oct 30.

Ott H, Sieber J, Brehler R, Fölster-Holst R, Kapp A, Klimek L, Pfaar O, Merk H. Efficacy of grass pollen sublingual immunotherapy for three consecutive seasons and after cessation of treatment: the ECRIT study. *Allergy*. 2009 Jan;64(1):179-86. Epub 2008 Nov 28

Van Overtvelt L, Lombardi V, Razafindratsita A, Saint-Lu N, Horiot S, Moussu H, Mascarell L, Moingeon P: IL-10-inducing adjuvants enhance sublingual immunotherapy efficacy in a murine asthma model. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;145(2):152-62. Epub 2007 Sep 11

Pajno G, Morabito L, Barberio G: Clinical and immunologic effects of long term sublingual immunotherapy in asthmatic children sensitized to mites: a double blind, placebo controlled study. *Allergy* 2000; 55:842-849

Pajno GB, Barberio G, De Luca F, Morabito L, Parmiani S: Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin Exp Allergy*. 2001 Sep;31(9):1392-7.

Passalacqua G, Albano M, Riccio A, Fregonese L, Puccinelli P, Parmiani S, Canonica GW: Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to *Parietaria* species: A double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Nov;104(5):964-8.

Passalacqua G, Senna G, Dama A, Riccio A, Crivellaro M, Canonica GW: The relationship between clinical efficacy of specific immunotherapy and serum intercellular adhesion molecule-1 levels. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 1998 Mar-Apr;8(2):123-4.

Penagos M, Compalati E, Tarantini F, et al : Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta analysis of randomized, placebo controlled, double blind trials. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006; 97(2):141-8

Pfaar O, Klimek L: Efficacy and safety of specific immunotherapy with a high-dose sublingual grass pollen preparation: a double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008 Mar;100(3):256-63.

Pinto LA, Stein RT, Kabesch M: Impact of genetics in childhood asthma. J Pediatr (RioJ).2008 Aug;84(4Suppl):S68-75

Pirquet C.v : Allergie. Münchner Medizinische Wochenschrift. 1906; 30:1457-1458

Plewako H, Arvidsson M, Oancea I, Hasséus B, Dahlgren U, Rak S: The effect of specific immunotherapy on the expression of costimulatory molecules in late phase reaction of the skin in allergic patients. Clin Exp Allergy. 2004 Dec;34(12):1862-7.

Pschyrembel, klinisches Wörterbuch. 1994. 257. Auflage. Berlin: De Gruyter

Razafindratsita A, Saint-Lu N, Mascarell L, Berjont N, Bardon T, Betbeder D, Van Overtvelt L, Moingeon P: Improvement of sublingual immunotherapy efficacy with a mucoadhesive allergen formulation. J Allergy Clin Immunol. 2007 Aug;120(2):278-85. Epub 2007 May 25

Ree,Chapman: The CREATE-Project –Allergy 2008;63:310-26

Renz H, Mutius E, Illi S, Wolkers F, Hirsch T, Weiland SK:T(H)1/T(H)2 immune response profiles differs between atopic children in eastern and western Germany. J Allergy Clin Immunol.2002 Feb;109(2):338-42

Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W et al:Exposure to farming in early life and developement of asthma and allergy: a cross-sectional survey. The Lancet. 2001 Oct 6;358(9288):1129-33.

Ring T, Fuchs T, Schultze-Wernighaus G. 2004.Weißbuch Allergie. 2.Auflage. München: Urban & Vogel

Roever AC, Heine G, Zuberbier T, Worm M: Allergen-mediated modulation of CD23 expression is interferon-gamma and IL-10 dependent in allergic and non-allergic individuals. Clin Exp Allergy. 2003 Nov;33(11):1568-75.

Schattner EJ: CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy. *Leuk Lymphoma*. 2000 May;37(5-6):461-72.

Shea KM, Truckner RT, Weber RW, Peden DB: Climate change and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Sep;122(3):443-53

Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA: A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):849-53.

Reber C 2006. Vergleich der Interleukin- und CD154-Expression in T-Zell Kulturen von gesunden und allergischen Kindern vor und nach spezifischer Immuntherapie. Dissertation. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Reich M, Niess JH, Bär C, Zwacka G, Markert UR: Elevated nonspecific plasma proteins in allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2003;13(1):60-5.

Ring J, Fuchs T, Schultze-Werninghaus G: Weißbuch Allergie in Deutschland. *Medizin & Wissen*, München 2004, p 57

Rojas-Ramos E, Garfias Y, Jiménez-Martínez Mdel C, Martínez-Jiménez N, Zenteno E, Gorocica P, Lascurain R: Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4(+) T cells from children with atopic asthma: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc*. 2007 Nov-Dec;28(6):659-66.

Romagnani S: Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today*. 1992 Oct;13(10):379-81

Romagnani S, Parronchi P, D'Elia MM, Romagnani P, Annunziato F, Piccinni MP, Manetti R, Sampognaro S, Mavilia C, De Carli M, Maggi E, Del Prete GF: An update on human TH1 and TH2 cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997 May-Jul;113(1-3):153-6

Rossi RE, Monasterolo G, Coco G, Silvestro L, Operti D: Evaluation of serum IgG4 antibodies specific to grass pollen allergen components in the follow up of allergic patients undergoing subcutaneous and sublingual immunotherapy. *Vaccine*. 2007 Jan 15;25(5):957-64. Epub 2006 Sep 11.

Savolainen J, Jacobsen L, Valovirta E: Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy*. 2006 Oct;61(10):1184-90.

Savolainen J, Nieminen K, Laaksonen K, Laiho T, Jacobsen L, Lahesmaa R, Terho EO, Valovirta E: Allergen-induced in vitro expression of Interleukin-18, SLAM and GATA-3 mRNA in PBMC during sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2007 Aug;62(8):949-53.

Scadding GK, Durham SR, Mirakian R, Jones NS, Drake-Lee AB, Ryan D, Dixon TA, Huber PA, Nasser SM; British Society for Allergy and Clinical Immunology: BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Clin Exp Allergy*. 2008 Feb;38(2):260-75. Epub 2007 Dec 20.

Schmidt S, Friedrichs F, Niggemann B, et al : Primärprävention von Allergien bei Kindern und Jugendlichen. *Pädiatrische Allergologie* 2003; 6 (01):6-15

Schneider S. 2005. Analyse immunologischer und klinischer Parameter von Allergikern unter sublingualer Immuntherapie. Dissertation. Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Sengler C, Haider A, Sommerfeld C, Lau S et al: Evaluation of CD14 polymorphism in the German Multicenter Allergy Cohort study. *Clin Exp Allergy*. 2003 Feb;33(2):166-9  
Statistisches Bundesamt 31.12.2007, Bundesärztekammer 31.12.1998

Steiner L. 2006. Studie zur Langzeitwirkung sublingualer Immuntherapie bei Allergikern. Dissertation. Jena: Friedrich-Schiller-Universität

Steiner L, Engel T, Nöding AH, Licht M, Delaney A, Distler A, Zwacka G, Markert UR. Description of Long Term Outcome of Sublingual Immunotherapy Treatment in Children: A Follow-Up Observation Through Phone Interviews *Open Allergy J* 2009, 2:30-37

Strachan DP : Hay Fever, Hygiene and household size. BMJ 1989 Nov 18;299(6710):1259-60

Tamarcaz P, Lambelet B, Keimer C, Hauser C: Ragweed (Ambrosia) progression and its health risks: will Switzerland resist this invasion ? Swiss Med Wkly. 2005 Sep 17;135(37-38):538-48

Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA: Mechanisms of immune suppression by IL-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. Immunology. 2006 Apr;117(4):433-42.

Thomson NC: The role of environmental tobacco smoke in the origins and progression of asthma. Curr Allergy Asthma Rep. 2007; 7(4):303-9

Tian D, Fu Z, Liu E, He Y, Wang X, Wang L: Therapeutic effect of intratracheal administration of murine IL-4 receptor antagonist on asthmatic airway inflammation. J Asthma. 2008 Oct;45(8):715-21.

van Bever HP, Vereecke IF, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ: Comparison between the in vitro cytokine production of mononuclear cells of young asthmatics with and without immunotherapy (IT) Clin Exp Allergy. 1998 Aug;28(8):917-20.

van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, Villalba M, Durham SR, Becker WM, Aalbers M, André C, Barber D, Cistero Bahima A, Custovic A, Didierlaurent A, Dolman C, Dorpema JW, Di Felice G, Eberhardt F, Fernandez Caldas E, Fernandez Rivas M, Fiebig H, Focke M, Fötisch K, Gadermaier G, Das RG, Gonzalez Mancebo E, Himly M, Kinaciyan T, Knulst AC, Kroon AM, Lepp U, Marco FM, Mari A, Moingeon P, Monsalve R, Neubauer A, Notten S, Ooievaar-de Heer P, Pauli G, Pini C, Purohit A, Quiralte J, Rak S, Raulf-Heimsoth M, San Miguel Moncin MM, Simpson B, Tsay A, Vailes L, Wallner M, Weber B: The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. Allergy. 2008 Mar;63(3):310-26.

von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Krämer U, Link E, Bollrath C, Brockow I, Koletzko S, Grübl A, Heinrich J, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D; GINIplus study group: Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: long-term results from the German Infant Nutritional Intervention Study (GINI). *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Jun;121(6):1442-7.

Wahn U.: What drives the allergic march? *Allergy*. 2000 Jul;55(7):591-9

Wahn U, Tabar A, Kuna P, Halken S, Montagut A, de Beaumont O, Le Gall M; SLIT Study Group: Efficacy and safety of 5-grass-pollen sublingual immunotherapy tablets in pediatric allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jan;123(1):160-166.e3. Epub 2008 Nov 29

Wang CR, Liu ST, Liu MF, Lee GL, Wang GR, Chuang CY: The effect of allergen immunotherapy on in vitro IL-4 and IFN-gamma production by peripheral mononuclear cells in house dust-sensitive Chinese patients with bronchial asthma. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1999 Dec;17(4):249-54

Wilson D, Torres Lima M, Durham S : Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. *The Cochrane Library* 2003; Issue 2

Wilson D, Torres Lima M, Durham S : Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis – systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2005; 60(1):1-3

Wong CK, Lun SW, Ko FW, Ip WK, Hui DS, Lam CW: Increased expression of plasma and cell surface co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD86 in adult patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*. 2005 Jul;141(1):122-9.

Yazdanbakhsh M, Kremsner P, Ree R: Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. *Science* 2002; 296:490-494



Zhu R, Liu G, Li W, Wang Z, Chen H, Zhang W: A study of costimulatory molecules in allergic allergic rhinitis patients *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2008 Sep;22(17):780-2, 784.

Zietkowski Z, Skiecko R, Tomasiak MM, Bodzenta-Lukaszyk A: Soluble CD40 ligand and soluble P-selectin in allergic asthma patients during exercise-induced bronchoconstriction *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008;18(4):272-8.

## **Danksagung**

Herrn P.D. Dr. med. Udo Markert danke ich für die Überlassung des Themas und die umfassende Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern des Placentalabors für ihre freundliche Unterstützung während der experimentellen Phase meinen Dank aussprechen.

Für die Bereitstellung der Proben und die Erfragung der klinischen Daten bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. G. Zwacka (Robert-Koch-Klinik Apolda) und seinem Team.

Letztlich bedanke ich mich bei meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung und bei meiner Lebensgefährtin Frau Michaela Kirst für ihre Geduld während der Ausarbeitung.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

**Name :** Jürgen Gäullein

**Geburtsdatum:** 23.09.1971

**Geburtsort :** Lauda

**Staatsangehörigkeit** deutsch

**Familienstand** ledig

---

### **Schulbildung**

09/1982 – 08/1992      Arnold Gymnasium Neustadt  
Abschluss : Allgemeine Hochschulreife

08/1992 – 10/1993      Zivildienst, ASB Neustadt bei Coburg

---

### **Medizinische Ausbildung**

10/1993 – 10/1996      Krankenpflegeausbildung am Klinikum Coburg

10/1996 – 6/2003      Studium der Humanmedizin an der FSU Jena  
Praktisches Jahr :  
Anästhesie an der FSU Jena  
Chirurgie am Texas Heart Institute, Houston, USA  
Innere Medizin Helios-Klinik Erfurt

7/2003 – 1/2008      Klinik für Anästhesie / Zentralklinik Bad Berka

1/2008 – 4/2009	Tätigkeit als freiberuflicher Notarzt im Landkreis Saalfeld und Rudolstadt
-----------------	---

seit 4/2009	Klinik für Anästhesie / Helios-Klinikum Erfurt
-------------	--

---

**Promotion**

10/1999 – 10/2000	Zeitraum der Datenerhebung und erste Laborarbeiten
-------------------	--

seit 1/2001	ergänzende Laborarbeiten im Plazentalabor der Universitätsfrauenklinik
-------------	---

ab 3/2009	Abschließende Arbeiten und Niederschrift
-----------	--

Jena, 16.1.2010

Jürgen Gäullein

## Publikationen

Markert UR, *Gäullein J*, Voigts J, Reich M, Zwacka G.

Klinische und immunologische Beobachtungen an Kindern unter sublingualer Immuntherapie  
Symposium Medical 2000; 11: 50-51.

*J. Gäullein, J. Voigts, M. Reich, G. Zwacka, U.R. Markert*

Preliminary analysis of clinical and immunological parameters of allergic patients during sublingual immunotherapy (Sublivac B.E.S.T.). International Congress of Immunology, July 2001, Stockholm, Sweden. Scand J Immunol, 2001, 54 (suppl. 1, Friday): 59.

Oral and poster presentation.

Markert UR, *Gäullein J*, Voigts J, Fitzgerald J, Reich M, Zwacka G.

Vorläufige Auswertung klinischer und immunologischer Parameter bei Patienten mit Allergien unter sublingualer Immuntherapie. XVII Colloquium Allergologicum, May 2001, Jena, Germany,

Voigts J, *Gäullein J*, Fitzgerald J, Reich M, Zwacka G, Markert UR,.

Vorläufige Auswertung klinischer und immunologischer Parameter bei Patienten mit Allergien unter sublingualer Immuntherapie. XVII Arbeitstagung für Pädiatrische Pneumologie und Allergologie, May 2001, Wustrow, Germany  
Allergologie, 2001, 24: 182.

Oral presentation.

Markert UR, Sahin F, Schneider S, Neundorf R, *Gäullein J*, Zwacka G.

Decrease of low affinity IgE receptor on B cells in patients under sublingual immunotherapy  
European Academy of Allergology and Clinical Immunology - Annual Meeting, June 2002, Naples, Italy.

*Gäullein J*, Voigts J, Zwacka G, Markert UR.

Klinische und immunologische Beobachtungen an Kindern unter sublingualer Immuntherapie  
Ärzteverband Deutscher Allergologen, September 2000, Bonn/Germany, oral presentation

*J. Gäullein*, J. Voigts, M. Reich, G. Zwacka, U.R. Markert

Preliminary analysis of clinical and immunological parameters of allergic patients during  
sublingual immunotherapy (Sublivac B.E.S.T.)

European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2000 - Annual Meeting, May  
2001, Berlin, Germany Allergy, 2001, 56 (suppl. 68): 280.

Poster presentation.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Herr PD Dr. med. habil. Udo R. Markert und Herr Prof. Dr. med. Zwacka,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 8. Januar 2010

Jürgen Gäullein